

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GILBERTO DELINSKI JUNIOR

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11

CURITIBA

2012

GILBERTO DELINSKI JUNIOR

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Saúde Humana e Animal, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª Drª Vanete Thomaz Soccol.

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

À professora Vanete Thomaz Soccol, pela orientação e críticas construtivas que me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente. Também por possibilitar a realização do sonho de trabalhar com pesquisa na área de saúde humana e animal.

A minha família e meus entes queridos, por todo apoio emocional e paciência que tiveram comigo. Espero que um dia possa recompensá-los pela minha ausência nestes dois anos.

Aos companheiros de bancada, em especial a Ludmilla Troiano e a Tânia Penha, por todo apoio técnico e emocional oferecido nesta árdua caminhada.

À professora Michele Spier, pelos conselhos técnicos e empréstimo de materiais de laboratório.

Ao químico Marcelo Ribani, por todo auxílio durante as etapas de cromatografia automatizada.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, por seu tempo dedicado ao aprimoramento deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pela oportunidade de aprendizado e pela estrutura física disponibilizada.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), por disponibilizar seus laboratórios e equipamentos ao projeto e por me aceitar recentemente como um de seus pesquisadores.

À Fundação Araucária pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A tuberculose bovina (TB) é causada pelo *Mycobacterium bovis* e aflige rebanhos em vários países do mundo. Estima-se que a doença leva a perdas anuais de três bilhões de dólares na agropecuária mundial, além da sua importância para a saúde pública. A prevalência e incidência da doença vêm decaindo nos últimos anos como resultado direto de programas de erradicação e controle de tuberculose. No Brasil, a TB é endêmica e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou em 2001 o programa brasileiro de controle desta doença. Neste programa, a principal ferramenta para o diagnóstico é o teste alérgico-cutâneo, que apresenta dificuldades técnicas de produção pelo lento crescimento do microrganismo. A fim de aprimorar esta tecnologia, a utilização de antígenos recombinantes mostra-se como alternativa promissora. O presente trabalho teve por objetivo a produção das proteínas recombinantes ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11 por fermentação de *Escherichia coli* e purificação através de metodologias aplicáveis industrialmente. Para redução do tempo de escalonamento, foi padronizada uma metodologia de produção de pré-inóculos transformados, que permaneceram estáveis por um ano quando mantidos a - 80°C. O processo de fermentação e produção das proteínas recombinantes foi realizado em agitador de bancada a 37°C e 200 rpm por 3 horas, levando à expressão das proteínas na forma de corpos de inclusão. Estes corpos foram solubilizados em tampão com uréia e purificados por cromatografia de afinidade em resina de níquel após rompimento celular por sonicação. As proteínas foram eluídas com alta pureza, e suas concentrações foram padronizadas por ultrafiltração. Ao final do processo, obteve-se altos rendimentos proteicos, 23,9 mg, 22,7 mg e 143,5 mg por litro de fermentado para as proteínas ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11, respectivamente. O alto rendimento obtido e a simplicidade dos processos de fermentação e purificação tornam a metodologia aplicável industrialmente. Estes insumos têm aplicação em diagnósticos com alta especificidade e em vacinas com capacidade de diferenciação de resposta vacinal e infeccional, seguindo as novas tendências nos diagnósticos de tuberculose bovina e humana.

Palavras-chave: Tuberculose bovina. Proteínas recombinantes. Expressão. Purificação.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium bovis* and afflicts livestock in many countries over the world. It is estimated that the disease leads to annual losses of three billion dollars in world agricultural livestock, besides its importance to public health. The prevalence and incidence of the disease have been declining in recent years as a direct result of eradication and control programs of tuberculosis. In Brazil, TB is endemic and the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento created in 2001 the Brazilian program to control this disease. In this program, the main tool for diagnosis is the skin test, which presents technical difficulties in production caused by the slow growth of the microorganism. To improve this technology, the use of recombinant antigens appears as a promising alternative. The present study aimed the production of recombinant proteins ESAT-6, CFP-10 and MTSP-11 by fermentation of *Escherichia coli* and purification through industrially applicable methodologies. In order to reduce the scale-up time, a methodology for production of transformed pre-inocula was standardized, which were stable for one year when stored at - 80°C. The fermentation process and production of recombinant proteins was performed in shaker at 37°C and 200 rpm by 3 hours, leading to expression of the proteins as inclusion bodies. These bodies were solubilized in buffer containing urea and purified by affinity chromatography on nickel resin after cell disruption by sonication. The proteins were eluted with high purity, and their concentrations were standardized by ultrafiltration. At the end of the process, high yields of protein were obtained, 23.9 mg, 22.7 mg and 143.5 mg per liter of fermentation for the proteins ESAT-6, CFP-10 and MTSP-11, respectively. The high yield and simplicity of the fermentation and purification processes makes the methodology applicable industrially. These antigens have application in diagnostics with high specificity and vaccines capable of vaccine and infection responses differentiation, following the new trends in human and bovine tuberculosis diagnoses.

Keywords: Bovine tuberculosis. Recombinant proteins. Expression. Purification.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EVOLUÇÃO DO TOTAL DE CASOS E DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE BOVINA NO BRASIL RELATADOS NO PERÍODO DE 1996 A 2004.....	18
FIGURA 2 - EVOLUÇÃO DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE BOVINA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2005 A 2010.....	18
FIGURA 3 - PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DO CERTIFICADO DE PROPRIEDADE LIVRE DE TUBERCULOSE SEGUNDO NORMAS DO PNCEBT.....	24
FIGURA 4 - PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DE CERTIFICADO DE PROPRIEDADE MONITORADA PARA BRUCELOSE E TUBERCULOSE SEGUNDO NORMAS DO PNCEBT.....	25
FIGURA 5 - ANDAMENTO DO ESTUDO NACIONAL DE PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE BOVINA.....	27
FIGURA 6 - PULMÃO E LINFONODO BOVINO COM PRESENÇA DE NÓDULOS CARACTERÍSTICOS DE TUBERCULOSE.....	29
FIGURA 7 - ESPECTRO DE RESPOSTAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO BOVINO FRENTE À INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS.....	38
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO pDEST17.....	43
FIGURA 9 - ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	47
FIGURA 10 - ETAPAS DE CULTIVO CELULAR DO PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	51
FIGURA 11 - ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS AMPLIFICADOS...	52
FIGURA 12 - ETAPAS DE PRODUÇÃO DOS PRÉS-INÓCULOS.....	54
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS ESAT-6 E CFP-10.....	64
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO MTSP-11.....	65

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Hind</i> III.....	65
FIGURA 16 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DOS PRÉ-INÓCULOS NAS CONDIÇÕES AVALIADAS APÓS 24 HORAS DE CONGELAMENTO.....	66
FIGURA 17 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DOS PRÉ-INÓCULOS NAS CONDIÇÕES AVALIADAS APÓS UM ANO DE CONGELAMENTO.....	66
FIGURA 18 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DOS PRÉ-INÓCULOS MANTIDOS A - 80°C APÓS UM DIA E UM ANO DE CONGELAMENTO.....	67
FIGURA 19 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE <i>E. coli</i> APÓS ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG) NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1, 0,5 E 1 mM.....	68
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DAS FASES DE CRESCIMENTO CELULAR EM CULTIVO DE <i>E. coli</i> APÓS ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG) NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1, 0,5 E 1 mM.....	69
FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS DA PROTEÍNA MSTP-11 APÓS ADIÇÃO DE IPTG NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1, 0,5 E 1 mM, EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE.....	70
FIGURA 22 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE <i>E. coli</i> PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11.....	71
FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE <i>E. coli</i> PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11.....	71
FIGURA 24 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DE SONICAÇÃO DA BIOMASSA BACTERIANA PARA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE.....	72

FIGURA 25 - CROMATROGRAMA DE PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE AFINIDADE COM NÍQUEL DA FRAÇÃO CLARIFICADA DE MTSP- 11.....	73
FIGURA 26 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA ESAT-6 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE...	74
FIGURA 27 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA CFP-10 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE...	75
FIGURA 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA CFP-10 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE...	75
FIGURA 29 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11 NA CONCENTRAÇÃO DE 1 mg/mL APÓS ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 3,5 kDa, EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SENSIBILIDADE APRESENTADA POR MÉTODOS DIRETOS DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE BOVINA.....	30
---	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DO TESTE CERVICAL SIMPLES.....	32
QUADRO 2 - CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DO TESTE CERVICAL COMPARATIVO.....	33
QUADRO 3 - CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE PRÉ-INÓCULOS TESTADAS.....	55
QUADRO 4 - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ESAT-6.....	60
QUADRO 5 - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CFP-10.....	61
QUADRO 6 - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA MTSP-11.....	61
QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO PBS UTILIZADO NA PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	63
QUADRO 8 – VELOCIDADES DE CRESCIMENTO (dx/dt) DOS PRÉ-INÓCULOS NAS CONDIÇÕES AVALIADAS.....	67
QUADRO 9 – VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO CELULAR NA PRESENÇA DE AGENTE INDUTOR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	69
QUADRO 10 – VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11 A CADA INTERVALO DE HORA.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% – porcentagem

Abs – unidade de absorbância

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

BACEN – Banco Central do Brasil

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*

bp – par de base

BVD – diarreia viral bovina

CFSPH – Centro para Segurança em Alimentos e Saúde Pública

cm – centímetros

°C – graus Celsius

DIVA – diferenciação de animais infectados e vacinados

DTT – ditionitrosol

dx/dt – velocidade de crescimento

ELISA – ensaio imunossorvente ligado a enzima

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA – Estados Unidos da América

g – grama (unidade de massa)

xg – gravidade

h – hora

HE – hematoxilina-eosina

IFN- γ – interferon gama

INE – Instituto Nacional de Doenças Respiratórias

IPTG – tiogalactopiranosídeo de isopropila

kDa – kilodalton

L – litro

LB – Luria-Bertani

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mAU – mili-unidade de absorbância

mg – miligrama

MHC – complexo (Principal) de histocompatibilidade

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

ng – nanograma

nL – nanolitro

nm – nanômetro

OGM – organismo geneticamente modificado

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

PBS – salina tamponada com fosfato

PCR – reação de polimerase em cadeia

PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose

PPD – derivado de proteínas purificadas

q.s.p – quantidade suficiente para

RFLP – polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TB – tuberculose bovina

TCC – teste cervical comparativo

TCS – teste cervical simples

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

TPC – teste da prega caudal

UV – luz ultravioleta

μ – velocidade específica de crescimento

μ g – micrograma

μ L – microlitro

μ m – micrômetro

V – volts

WAHID – Banco Mundial de Informação da Saúde Animal

WHO – Organização Mundial da Saúde

ZN – Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 TUBERCULOSE BOVINA	16
1.1.1 Patógeno	16
1.1.2 Dados epidemiológicos.....	17
1.1.3 Impacto econômico.....	19
1.1.4 Transmissão e infecção	19
1.1.5 Transmissão de tuberculose bovina para humanos	20
1.2 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE ANIMAL (PNCEBT).....	21
1.2.1 Certificação de Propriedade Livre de Tuberculose	23
1.2.2 Propriedade Monitorada para Brucelose e Tuberculose.....	24
1.2.3 Dificuldades do PNCEBT	26
1.3 PROCEDIMENTOS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BOVINOS.....	27
1.3.1 Diagnóstico Clínico	28
1.3.2 Diagnóstico Anatomopatológico	28
1.3.3 Diagnóstico Bacteriano	29
1.3.4 Utilização como metodologia diagnóstica complementar	30
1.3.5 Diagnóstico Alérgico-Cutâneo (PPD).....	31
1.4 PESQUISAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS DIAGNÓSTICOS PARA TUBERCULOSE BOVINA	34
1.4.1 Limitações do diagnóstico por PPD	34
1.4.2 Novas propostas para contornar a falta de sensibilidade e de especificidade do diagnóstico por PPD.....	35
1.4.3 Aplicação de diagnósticos diferenciais	38

1.5 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE.....	41
1.5.1 Expressão de proteínas heterólogas em <i>E. coli</i>	41
1.5.2 Sistema de expressão, vetor e inserto.....	42
1.5.3 Vantagens da produção de antígenos por via recombinante.....	44
2 OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 LINHAGEM CELULAR.....	46
3.2 PLASMÍDEOS.....	47
3.3 PREPARO DE MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES	48
3.3.1 Meio Luria-Bertani (LB).....	48
3.3.2 Solução Estoque de Ampicilina e Cloranfenicol.....	48
3.4 PARÂMETROS CINÉTICOS	48
3.5 PRODUÇÃO DE BANCO DE CÉLULAS <i>E. coli</i> QUIMIOCOMPETENTES	49
3.6 AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS	50
3.7 PRODUÇÃO DOS PRÉ-INÓCULOS	53
3.8 TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	56
3.9 FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES ..	57
3.10 PURIFICAÇÃO	57
3.10.1 Centrifugação	58
3.10.2 Sonicação	58
3.10.3 Solubilização e clarificação.....	59
3.10.4 Cromatografia de Afinidade	59
3.10.5 Dosagem de Proteína.....	62
3.10.6 Análise em SDS-PAGE.....	62

3.10.7 Ultrafiltração.....	62
4 RESULTADOS	64
4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS	64
4.2 PRODUÇÃO DOS PRÉ-INÓCULOS	65
4.3 TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	68
4.4 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	70
4.5 PURIFICAÇÃO	72
4.5.1 Sonicação	72
4.5.2 Cromatografia de Afinidade	73
4.5.3 Ultrafiltração.....	76
5 DISCUSSÃO	77
5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS	77
5.2 PRODUÇÃO DE PRÉ-INÓCULOS	77
5.3 TESTE DE INDUÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG	78
5.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	79
5.4.1 Crescimento celular de <i>E. coli</i> para expressão.....	79
5.4.2 Expressão das proteínas recombinantes.....	81
5.4.3 Purificação das proteínas recombinantes.....	81
5.5 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	83
5.5.1 Sonicação	83
5.5.2 Cromatografia de afinidade.....	84
5.5.3 Padronização das amostras	85
6 CONCLUSÕES	88
7 PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS	94

ANEXO 1 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS INSERTOS CODIFICANTES PARA AS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11.....	94
ANEXO 2 – FORMULAÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NAS ETAPAS DE SONICAÇÃO E CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE.....	95
ANEXO 3 – FORMULAÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NO SDS-PAGE	96
ANEXO 4 – COMPOSIÇÃO DO GEL DE ELETROFORESE DO SDS-PAGE	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE BOVINA

A tuberculose bovina (TB) é causada por *Mycobacterium bovis* e acomete bubalinos, animais domésticos, algumas espécies selvagens e o homem. A bactéria leva o animal infectado a desenvolver lesões nodulares progressivas, conhecidas como tubérculos. Os tubérculos podem localizar-se em qualquer órgão, mas são predominantemente encontrados em linfonodos da região torácica e da cabeça, pulmão, intestinos, fígado, baço, pleura e peritônio. (OIE, 2009). A TB encontra-se disseminada por todo o território nacional, embora sua prevalência não esteja bem caracterizada ainda. Esta doença atinge tanto gado de corte quanto gado de leite. (BRASIL. MAPA, 2006).

1.1.1 Patógeno

As bactérias do gênero *Mycobacterium* pertencem à família *Mycobacteriaceae*, e são bastonetes curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados e não flagelados, medindo entre 0,5 e 7 µm de comprimento e 0,3 µm de largura. Têm como principal característica a álcool-ácido-resistência (BAAR). Contudo, estas características são compartilhadas com outros gêneros, principalmente *Nocardia*. (BRASIL. MAPA, 2006).

As micobactérias do complexo *M. tuberculosis* incluem *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum* e são as principais causadoras de tuberculose em mamíferos. *Mycobacterium bovis* apresenta um grande espectro de patogenicidade e pode infectar também humanos, onde desenvolve a chamada tuberculose zoonótica. *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose humana, também pode infectar bovinos. Embora não leve ao desencadeamento da doença, pode sensibilizar os animais ao teste tuberculínico.

O complexo MAIS inclui, entre outros, o *M. avium*, causador da tuberculose em aves. *Mycobacterium avium* não é patogênico aos bovinos e bubalinos, mas também leva à reação cruzada no teste de tuberculinização. Estas respostas inespecíficas dificultam o diagnóstico de tuberculose e apresentam um impacto

econômico considerável na medida em que obrigam o sacrifício de animais falso-positivos. (BRASIL. MAPA, 2006).

1.1.2 Dados epidemiológicos

Em levantamentos realizados no período de 1989 a 1998, dados oficiais indicam uma prevalência média nacional de 1,3% de animais infectados. Em estudo realizado no Triângulo Mineiro e nas regiões do centro e sul de Minas Gerais, em 1999, a prevalência encontrada foi de 0,8%. Das 1.600 propriedades avaliadas, totalizando 23.000 animais, detectou-se que 5% continham animais infectados. Este número subiu para 15% quando consideradas apenas as unidades produtoras de leite com algum grau de mecanização da ordenha e de tecnificação da produção. (BRASIL. MAPA, 2006). Estes são os últimos dados epidemiológicos oficiais publicados.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o número de novos casos no Brasil manteve-se entre 182 e 876 no período de 1996 e 2004, com média de 558 novos casos por ano (FIGURA 1). Já o número acumulado de casos registrados teve grande flutuação, iniciando o mesmo período em 3484 casos em 1996 e chegando a 2003 casos no ano de 2004. No entanto, sabe-se que esses dados são subestimados por se tratar de um período onde a notificação de casos confirmados às autoridades não era obrigatória.

Segundo dados fornecidos pelo Banco Mundial de Informações da Saúde Animal (WAHID), a incidência de tuberculose bovina no Brasil vem decaindo nos últimos anos. Os dados notificados à OIE revelam que a incidência chegou a 1460 em 2006, caindo para 1264 em 2010 (FIGURA 2). No primeiro semestre de 2011 foram notificados 486 novos casos, 132 casos a menos que no mesmo período de 2010.

A prevalência da tuberculose animal vem reduzindo em países que implantaram programas de controle baseados na eliminação de animais reagentes positivos, controle do trânsito de animais e inspeção das carcaças em abatedouros à procura de lesões características. Atualmente ela é maior em países em desenvolvimento. Alguns países desenvolvidos já consideram a tuberculose bovina erradicada como Austrália, Suíça, Canadá, vários países da Europa e grande parte dos Estados Unidos. (DE LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

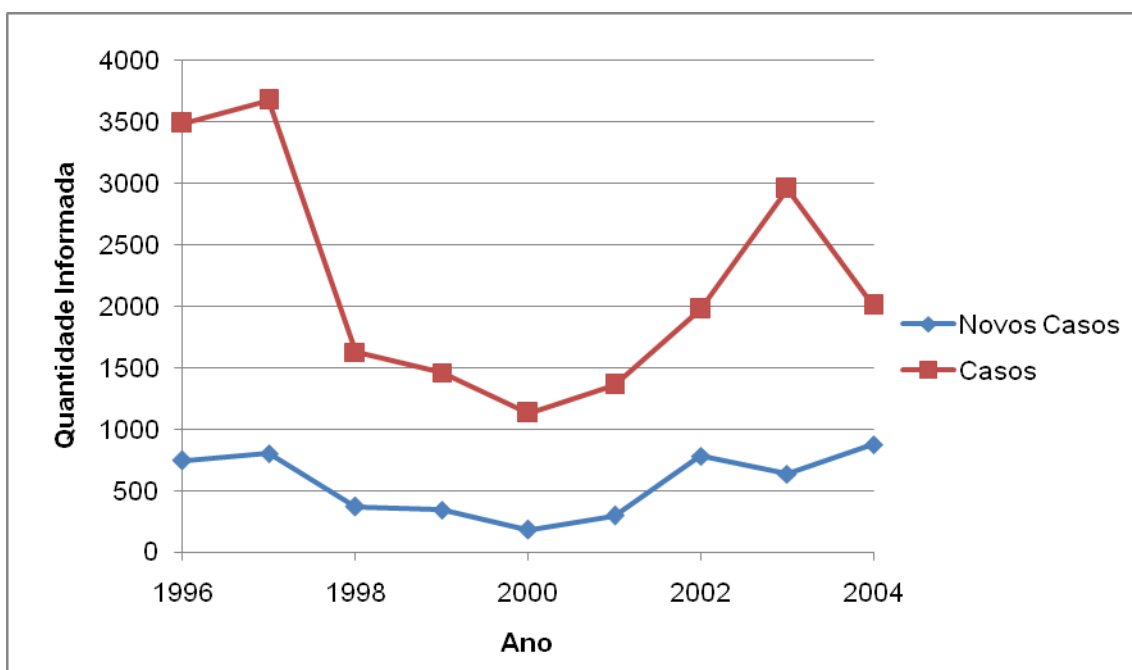


FIGURA 1 - EVOLUÇÃO DO TOTAL DE CASOS E DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE BOVINA NO BRASIL RELATADOS NO PERÍODO DE 1996 A 2004
 FONTE: HANDISTATUS II (2012)

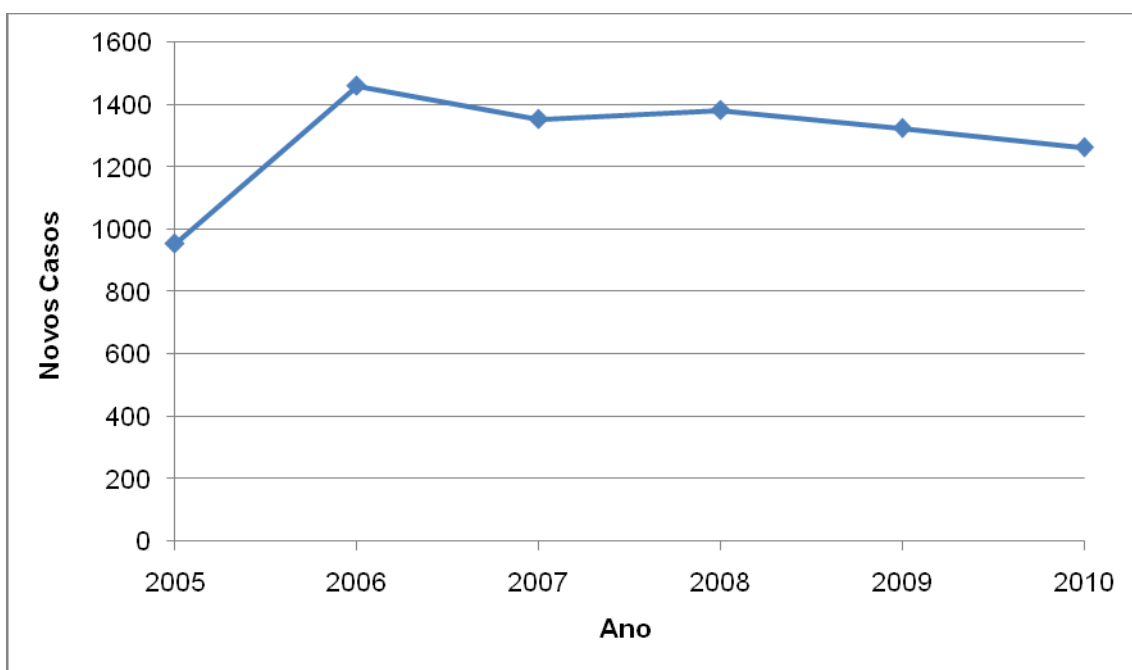


FIGURA 2 - EVOLUÇÃO DE NOVOS CASOS DE TUBERCULOSE BOVINA NO BRASIL NO PERÍODO DE 2005 A 2010
 FONTE: BANCO MUNDIAL DE INFORMAÇÕES DA SAÚDE ANIMAL (2012)

Outros países como Japão, Inglaterra, Nova Zelândia e México, onde a tuberculose animal encontra-se em fase final de erradicação, apresentam baixa prevalência da doença. Nestes casos a dificuldade de erradicação geralmente encontra-se na existência reservatórios silvestres do agente patogênico, ou então na

forte influência de respostas inespecíficas provocadas por micobactérias ambientais. A falta de estrutura nos abatedouros e nas unidades de produção também é limitante na erradicação da doença. (DE LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006; CFSPH, 2007).

1.1.3 Impacto econômico

Pouca atenção é dada à TB por ser uma doença crônica e os sinais clínicos aparecerem em estágios muito avançados da doença, principalmente em unidades com boa estrutura física e cuidados nutricionais. A importância econômica da doença é geralmente relacionada às perdas diretas dos animais em abates, redução do ganho de peso ou da produção de leite ou ainda do não aproveitamento da carne das carcaças que apresentem lesões características. (BRASIL. MAPA, 2006). Estima-se redução na produtividade destes animais em torno de 10% a 25%. Outra perda significativa é da credibilidade da unidade de produção onde a doença é encontrada. Dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) apontam para perdas anuais de três bilhões de dólares ao ano na agropecuária mundial. (EMBRAPA, 2009).

Kantor e Ritacco (1994), em estudo realizado na Argentina no final dos anos 1980s, mostram que a perda na produção leiteira em rebanhos tuberculosos chegou a 18% pela redução da frequência e duração da fase de lactação.

1.1.4 Transmissão e infecção

Em rebanhos livres da doença, a principal forma de introdução da tuberculose é pela aquisição de animais infectados. Outras espécies de mamíferos como marsupiais, texugos e cervídeos podem funcionar como reservatórios de *M. bovis* e dificultar na erradicação da doença, especialmente em áreas de baixa prevalência.

No Brasil esse tipo de estudo ainda não foi feito, mas vários animais comuns no país já foram identificados como possíveis reservatórios em outros países como ovinos, eqüinos, suínos, caprinos, roedores, felinos, caninos e primatas. (OIE, 2009).

A infecção ocorre por inalação de micobactérias eliminadas pelo ar expirado, fezes, urinas, leite e outros fluidos corporais de animais infectados. A forma de eliminação depende do órgão infectado e tem início antes do aparecimento dos

sintomas clínicos, os quais muitas vezes nem chegam a aparecer. A infecção de novos animais se dá principalmente pela via respiratória (90% dos casos), mas também pode ocorrer pela via digestiva através da alimentação com leite (amamentação de bezerros), carne crua ou água contaminados.

As bactérias podem sobreviver por vários meses em estábulos ao abrigo da luz. Em consequência, a aglomeração de animais dentro destes ambientes favorece a disseminação da doença, cenário bastante comum em unidades com rebanhos leiteiros.

A incidência da tuberculose é mais freqüente em rebanhos leiteiros, embora atinja índices semelhantes em rebanhos de corte mantidos em igual situação de confinamento. (BRASIL. MAPA, 2006).

1.1.5 Transmissão de tuberculose bovina para humanos

A transmissão da TB para humanos, chamada de tuberculose zoonótica, constitui um problema de saúde pública mundial. No entanto, os dados sobre tuberculose zoonótica são escassos. Registros feitos por Ruggiero e colaboradores (2007) indicam que na América Latina, 2% dos casos pulmonares e 8% dos casos extrapulmonares, em humanos, são provocados por *M. bovis*. Nos anos 1990s, 70 a 80% de tuberculose localizada em linfonodos cervicais em crianças e 20% da tuberculose renal em adultos também tiveram origem por *M. bovis*.

Em relatório técnico, a EMBRAPA citou pesquisas da Organização Mundial de Saúde (WHO) apontando que 5% das ocorrências de tuberculose em humano tenham sido provocados pelo patógeno bovino. (EMBRAPA, 2009).

A incidência de tuberculose pulmonar humana causada por *M. bovis* é maior em trabalhadores das unidades criadoras de gado e de abatedouros. Os programas de controle e erradicação de tuberculose, incluindo o brasileiro, exigem que estes profissionais se submetam ao diagnóstico constantemente. Em geral, estes programas também ajudaram na redução dos casos de tuberculose em humanos. (OIE, 2009).

O Instituto Nacional de Doenças Respiratórias Emilio Coni (INE E. Coni) de Santa Fé, Argentina, em estudo feito entre 1988 e 2006, demonstrou a maior exposição dos trabalhadores ligados à criação e abate dos animais. Dos 2485 casos de tuberculose pulmonar diagnosticados neste período, observou-se um declínio na

porcentagem de relatos de *M. bovis*: 2,7% entre 1988 e 1993, 1,7% de 1994 a 1999 e 1,3% entre 2000 e 2006. Nestes casos, 70% dos pacientes haviam trabalhado com bovinos, a maioria deles em abatedouros. (DE KANTOR *et al*, 2008).

A transmissão é similar àquela que ocorre entre bovinos: inalação de aerossóis e contato com fluidos corporais contaminados, principalmente leite, cuja pasteurização elimina o risco de transmissão. Vários estudos que avaliam a ligação entre *M. bovis* e a tuberculose humana dão especial atenção à indústria de laticínios e derivados em regiões sem tradição de pasteurização. O consumo de carne contaminada, principalmente vendida em açougues clandestinos, também apresenta fator de risco considerável. (EMBRAPA, 2009).

A infecção humana por *M. bovis* pode ser assintomática ou desenvolver-se logo após a infecção. Há relatos de casos que evoluíram clinicamente após muitos anos devido à queda do sistema imune do hospedeiro, levando à reativação da infecção. A doença pode afetar vários órgãos, entre linfonodos, pele, ossos e articulações, meninges e órgãos do sistema urogenital e respiratório. Crianças que ingeriram leite contaminado podem desenvolver linfadenopatia cervical, aumentando o volume dos gânglios cervicais. Esses gânglios podem se romper, provocando lesões na pele conhecidas como lúpus vulgaris. As doenças pulmonares são mais comuns em pessoas com infecções reativadas e incluem sintomas como febre, tosse, dor no peito, cavitação e hemoptise. Infecções no sistema urogenital podem levar à perda das funções renais. As infecções por *M. bovis* podem, de modo geral, ser tratadas com drogas antimicrobianas, mas levam à morte se negligenciadas. (CFSPH, 2007).

1.2 PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA BRUCELOSE E TUBERCULOSE ANIMAL (PNCEBT).

Em 2001 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Este programa visa atenuar os problemas da brucelose e da tuberculose na saúde humana e animal, além de melhorar a competitividade da pecuária brasileira. Apenas com a instituição do PNCEBT os critérios e procedimentos para o levantamento da prevalência da tuberculose no Brasil começaram a ser regulamentados. (BRASIL. MAPA, 2006).

Como objetivos do programa, têm-se: (a) redução da prevalência e incidência de novos focos de brucelose e tuberculose; (b) definição de uma estratégia de certificação de propriedades livres e monitoradas para essas zoonoses. (BRASIL. MAPA, 2006).

A estratégia de ação do PNCEBT baseia-se na adesão voluntária dos produtores visando à certificação de suas propriedades dentro das classificações de “livres” ou “monitoradas”. Esta certificação torna-se então um instrumento para agregação de valor aos seus produtos. Elas atendem às exigências internacionais para exportação de produtos de origem animal e, por isso, melhoram a imagem do produto brasileiro, facilitando a negociação do Governo pela abertura de novos mercados. (BRASIL. MAPA, 2006).

O Programa inclui medidas visando: (a) capacitação de médicos veterinários e laboratórios oficiais e particulares; (b) padronização dos métodos diagnósticos utilizados; (c) viabilização da fiscalização e monitoramento das zoonoses; e (d) integração do serviço de defesa sanitária com o serviço oficial de inspeção de produtos de origem animal.

De forma geral, o processo de saneamento de TB em uma propriedade é feito por meio do teste de todo ou de parte dos animais, sacrificando-se ou descartando aqueles que forem reagentes. Apenas animais com idade superior ou igual a seis semanas podem ser avaliados. Em casos de resultados inconclusivos ou duvidosos, a repetição do teste alérgico-cutâneo só pode ser realizada após o período de 60 dias. Caso algum animal seja diagnosticado como positivo, o processo de saneamento volta ao estágio inicial. Dependendo do tipo de certificado que se busque (propriedade livre ou monitorada), o número de animais testados, a frequência de repetição e o tempo de duração da avaliação são diferentes. (BRASIL. MAPA, 2006).

O diagnóstico de TB em campo deve ser feito por médicos veterinários habilitados pelo MAPA que tenham sido aprovados no curso de treinamento em métodos de diagnóstico e controle de brucelose e tuberculose. O Serviço Veterinário Oficial pode realizar testes por amostragem em qualquer propriedade certificada deliberadamente e também deve acompanhar os testes finais que conferem o certificado de propriedade livre. Assim, tem-se maior controle na qualidade e veracidade dos diagnósticos obtidos, aumentando a confiabilidade nos dados epidemiológicos levantados. (BRASIL. MAPA, 2006).

1.2.1 Certificação de Propriedade Livre de Tuberculose

Os procedimentos de avaliação e emissão de certificados de propriedades livres seguem padrões estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e são reconhecidos internacionalmente (FIGURA 3). Para isso, todo o rebanho é testado durante o período mínimo de nove meses. Após a obtenção de três avaliações sem nenhum animal reagente, a propriedade obtém o certificado de propriedade livre para a doença avaliada (tuberculose ou brucelose). O intervalo de tempo entre a primeira e a segunda avaliação é de 90 a 120 dias, e entre a segunda e a terceira avaliação é de 180 a 240 dias. As duas primeiras avaliações devem ser feitas por médico veterinário habilitado pelo MAPA junto ao responsável técnico pela produção da propriedade. A avaliação final é realizada pelo médico veterinário habilitado pelo MAPA junto ao veterinário do Serviço Veterinário Oficial. Todo animal reagente positivo deve ser descartado e o produtor volta a necessitar de uma sequência de três testes sem reatividade para obtenção do certificado. (BRASIL. MAPA, 2006).

Para manutenção do certificado de propriedade livre é necessário o cumprimento de regras e normas sanitárias pré-estabelecidas, tais como: (a) a repetição anual dos testes em todo o rebanho, salvo animais com idade inferior a seis semanas, (b) a exigência de dois testes negativos para todo animal que for inserido na propriedade, caso ele não seja proveniente de outra propriedade livre, e (c) a propriedade deve ter supervisão técnica de médico veterinário habilitado. (BRASIL. MAPA, 2006).

A dificuldade de aplicação destas regras é grande dentro da realidade da pecuária nacional, principalmente nas criações extensivas de gado de corte, pois o número de animais por proprietário é muito elevado. Portanto, foi criada uma segunda certificação. (BRASIL. MAPA, 2006).

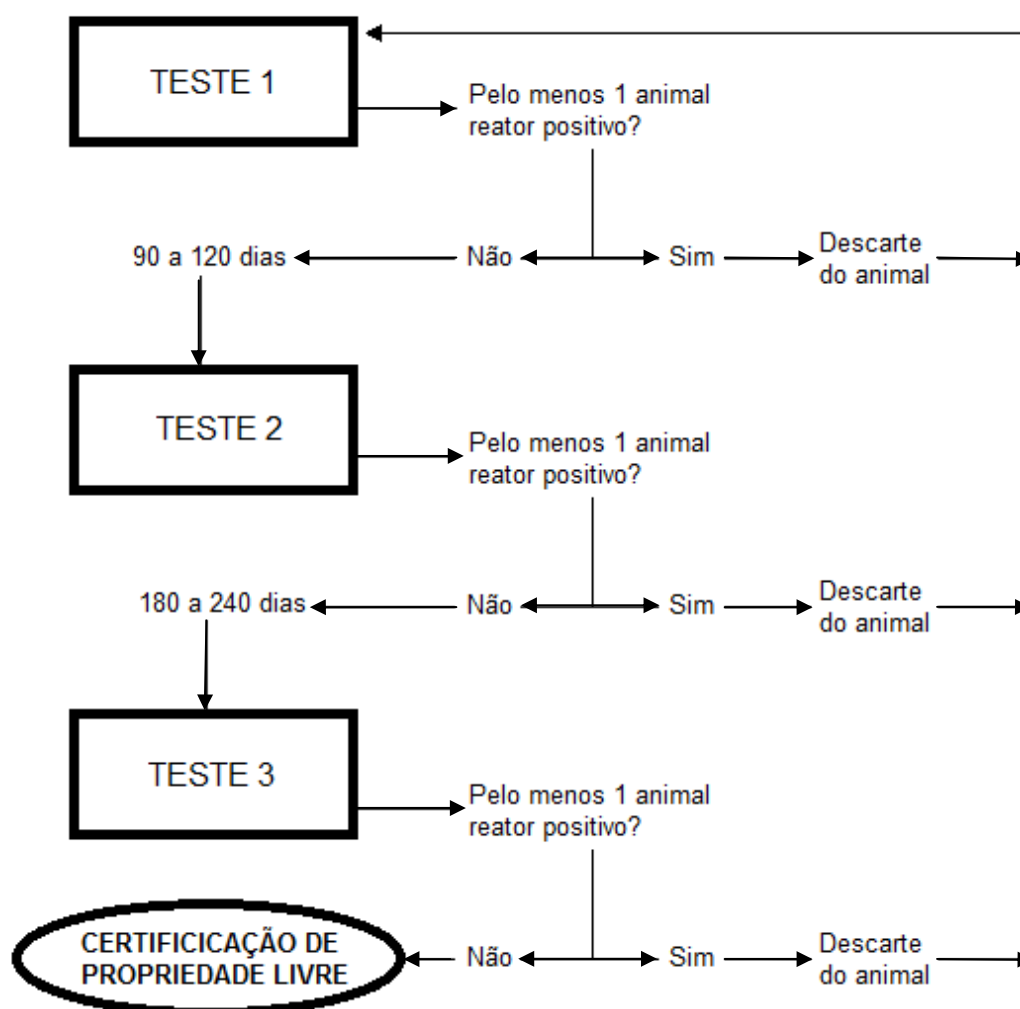


FIGURA 3 - PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DO CERTIFICADO DE PROPRIEDADE LIVRE DE TUBERCULOSE SEGUNDO NORMAS DO PNCEBT
 Fonte: O autor (2012)

1.2.2 Propriedade Monitorada para Brucelose e Tuberculose

No modelo de propriedade monitorada para brucelose e tuberculose, também de adesão voluntária, os testes são realizados por amostragem (FIGURA 4). Caso não haja detecção de animal reagente para nenhuma das duas zoonoses, a propriedade receberá o certificado de “propriedade monitorada para brucelose e tuberculose”. Caso haja animais reagentes, o teste deve ser aplicado nos animais não submetidos à primeira avaliação, sendo sacrificado todo animal diagnosticado com tuberculose ou brucelose. Depois de um período mínimo de 60 a 90 dias, o

teste deve ser feito. Após o primeiro teste sem positividade, a propriedade pode receber o certificado. Nesta classificação os testes são feitos com frequência anual para os dois primeiros anos e a cada dois anos após este período. (BRASIL. MAPA, 2006).

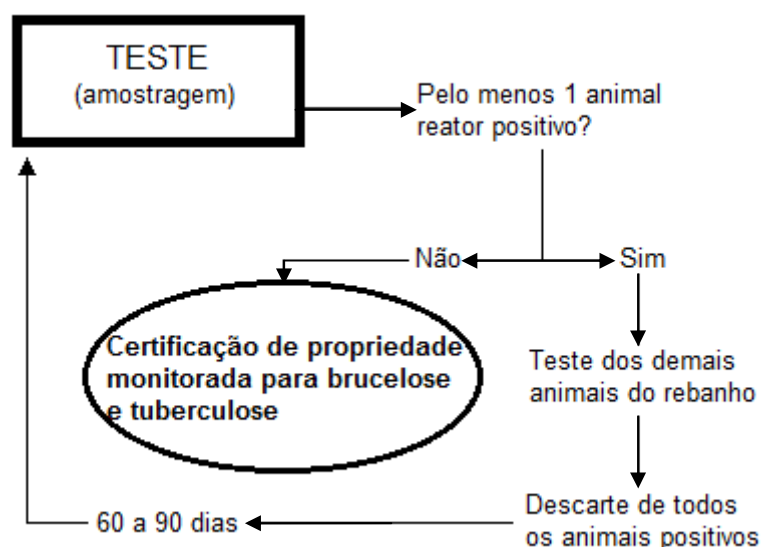


FIGURA 4 - PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DE CERTIFICADO DE PROPRIEDADE MONITORADA PARA BRUCELOSE E TUBERCULOSE SEGUNDO NORMAS DO PNCEBT
FONTE: O autor (2012)

As condições para manutenção do certificado de propriedade monitorada para brucelose e tuberculose são similares àsquelas da certificação de propriedade livre. Neste caso, novos animais a serem inseridos na propriedade devem ter dois testes negativos, ou então serem provenientes de propriedades certificadas como monitoradas ou livres. (BRASIL. MAPA, 2006).

Uma vez que essa classificação foi criada com o objetivo de facilitar a certificação de propriedades com grande número de animais em criação extensiva, a certificação de “propriedade monitorada para brucelose e tuberculose” só pode ser conferida a unidades criadoras de gado de corte. As unidades produtoras de gado leiteiro só podem receber o certificado de propriedades livres de brucelose e/ou tuberculose. (BRASIL. MAPA, 2006).

1.2.3 Dificuldades do PNCEBT

Na prática, o PNCEBT enfrenta problemas no cumprimento de seus objetivos, principalmente pela baixa adesão dos produtores.

O custo de produção nas unidades que aderem ao programa torna-se mais elevado devido às exigências sanitárias e técnicas. Como no mercado nacional não há exigência de certificados de qualidade indicando a origem dos produtos, o incentivo previsto pelo programa torna-se falho. De acordo com reportagem apresentada pelo portal Univates, em dezembro de 2010, apenas 120 propriedades haviam aderido ao programa e obtido a certificação, das quais 50% localizavam-se no estado do Rio Grande do Sul. (UNIVATES, 2010).

Outro problema é o abate dos animais reagentes positivos. As dificuldades encontram-se não só na operação de abate em si (técnica e local mais adequados, incluindo transporte se necessário, decididos pelos responsáveis oficiais), mas também no receio do produtor de perder um grande número de animais em caso de reação positiva. Embora exista uma linha de crédito do Banco Central do Brasil (BACEN) voltada para substituição de animais abatidos em função do programa, este recurso não é muito utilizado.

A realização das análises, emissão de documentos e transferência de informações entre membros do programa é lenta e freqüentemente falha, o que compromete seu dinamismo. A avaliação dos dados torna-se mais lenta e a rede de informação que deveria auxiliar no levantamento da prevalência e incidência fica comprometida. (BRASIL. MAPA, 2010).

Dados do segundo semestre de 2010, fornecidos pelo MAPA, revelam que apenas no Distrito Federal a prevalência da tuberculose foi determinada (FIGURA 5). O levantamento da prevalência está em execução nos estados da Bahia, Paraná, Mato Grosso e Rondônia. Já nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estes estudos foram apenas delineados. Embora quase 10 anos tivessem transcorrido após a criação do PNCEBT no momento da avaliação, percebe-se que o levantamento completo da prevalência estava longe de ser concluído.

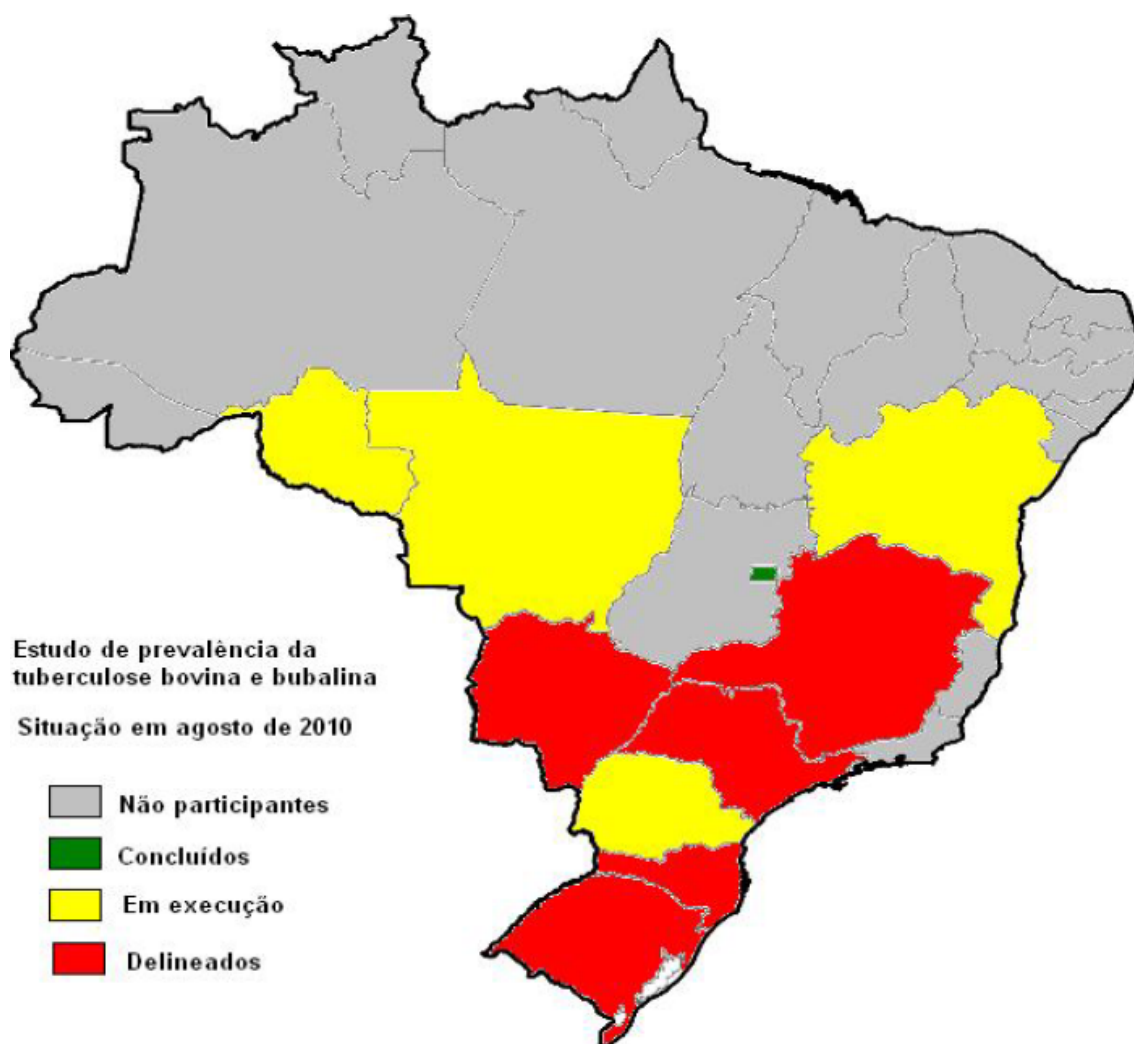


FIGURA 5 - ANDAMENTO DO ESTUDO NACIONAL DE PREVALÊNCIA DA TUBERCULOSE BOVINA
 FONTE: BRASIL. MAPA (2010)

1.3 PROCEDIMENTOS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE EM BOVINOS

O diagnóstico de tuberculose inclui métodos diretos e indiretos. Os diretos são aqueles que identificam a micobactéria no material biológico, enquanto os métodos indiretos são aqueles que buscam a resposta imunológica do animal frente ao agente etiológico.

Há dois tipos de resposta imunológica: a primeira é mediada por anticorpos produzidos por linfócitos, chamada de resposta humoral; a segunda é mediada por células do sistema imunológico como macrófagos e linfócitos, chamada de resposta celular. (BRASIL. MAPA, 2006).

Os métodos anatomopatológico e bacteriológico são aplicados em exames *post mortem*, como ferramenta de confirmação de resultado e controle em abatedouros. Devido à dificuldade de obtenção de amostras biológicas de animais vivos, sua aplicação como teste *in vivo* é bastante restrita. Para este fim, utilizam-se os métodos indiretos, principalmente o teste tuberculínico, além do diagnóstico clínico. (FRÁGUAS *et al.*, 2008).

1.3.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico consiste na busca dos sintomas provocados por *M. bovis* em bovinos, principalmente: caquexia progressiva; tosse seca, curta e repetitiva; cansaço e baixa capacidade respiratória quando submetidos à marcha forçada; e linfadenomegalia localizada ou generalizada. (BRASIL. MAPA, 2006).

O diagnóstico clínico nem sempre é utilizado, pois o aparecimento desses sintomas, quando ocorre, acontece apenas em estágios muito avançados da doença. Nesta fase os animais costumam ser anérgicos à tuberculinização.

1.3.2 Diagnóstico Anatomopatológico

O diagnóstico anatomopatológico, também chamado de macroscópico, consiste na inspeção de carcaça ou necropsia detalhada na busca por lesões características da tuberculose. O encontro das lesões não garante o diagnóstico da tuberculose e a ausência também não garante que o animal não esteja infectado. No entanto, este método ainda é muito importante nos estudos da tuberculose e é realizado durante a inspeção em abatedouros.

As lesões características apresentam coloração amarelada em bovinos e levemente esbranquiçadas em búfalos. São nódulos de 1 a 3 cm de diâmetro, de aspecto purulento ou caseoso, apresentando cápsulas fibrosas ou ainda necrose e calcificação no centro da lesão (FIGURA 6). Estas lesões são encontradas em linfonodos, pulmão e fígado em 95% dos casos. Em 70 a 90% dos casos, encontra-se em linfonodos de cabeça e tórax. Uma única lesão é encontrada por animal em 66% dos casos.

Fragmentos de tecidos com esses tipos de lesões podem ser encaminhados para o exame histopatológico após fixação em lâmina e coloração com hematoxilina-eosina (HE), à procura de lesões granulomatosas.



FIGURA 6 - PULMÃO E LINFONODO BOVINOS COM PRESENÇA DE NÓDULOS CARACTERÍSTICOS DE TUBERCULOSE
FONTE: CFSPH (2012)

1.3.3 Diagnóstico Bacteriano

O diagnóstico bacteriológico é considerado o método padrão ouro para confirmação de tuberculose bovina. Amostras frescas são fixadas em lâminas e coradas com o método de Ziehl-Neelsen (ZN) para pesquisa de bacilos álcool ácido resistente (BAAR). Contudo, a sensibilidade do método é baixa, e a característica tintorial não distingue alguns gêneros como *Mycobacterium* e *Nocardia*.

Após descontaminação e preparo das amostras, é possível realizar o isolamento dos bacilos em meio de cultivo (principalmente Löwenstein-Jensen, a base de ovo, e Middlebrook, a base de ágar) com incubação a 37°C de 30 a 90 dias. As colônias isoladas podem ser identificadas pela coloração ZN, por provas bioquímicas ou marcadores moleculares. (OIE, 2009). Devido às dificuldades técnicas, o diagnóstico bacteriológico só é necessário em situações específicas, como:

- confirmação de resultado obtido por outro método (geralmente tuberculinização) em regiões onde não haja registros anteriores de ocorrência da tuberculose bovina ou em propriedades consideradas livres;
- em amostras de animais reativos ao teste alérgico-cutâneo, mas que não apresentaram lesões macroscópicas sugestivas, sendo extraídas de linfonodos do trato intestinal e respiratório;
- em carcaças com lesões sugestivas provenientes de propriedades monitoradas ou de animais com reações inespecíficas.

1.3.4 Utilização como metodologia diagnóstica complementar

Os métodos acima citados não são utilizados isoladamente como formas de diagnóstico de TB, mas sim de forma complementar ao teste alérgico-cutâneo descrito a seguir. Isto acontece, em grande parte, devido as suas baixas sensibilidades.

Em estudo comparativo realizado por Fráguas e colaboradores (2008), em um grupo de 97 animais reagentes positivos ao teste alérgico-cutâneo, o diagnóstico macroscópico apresentou sensibilidade de 72,16%, enquanto o diagnóstico bacteriano por cultura apresentou sensibilidade de apenas 11,34% (TABELA 1).

TABELA 1 - SENSIBILIDADE APRESENTADA POR MÉTODOS DIRETOS DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE BOVINA

Teste	Sensibilidade (%) *
Macroscopia	72,16
Histopatológico	64,95
Baciloscopia	48,94
Cultura	11,34

FONTE: Adaptado de FRÁGUAS *et al* (2008)

NOTA: (*) Em relação a um grupo de 97 animais reagentes positivos ao teste alérgico-cutâneo

Apesar da baixa sensibilidade, a importância destes métodos se dá devido à sua facilidade de execução, no caso do teste anatomopatológico e da baciloscopia, ou à sua grande especificidade, no caso da cultura.

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular também levou ao surgimento de métodos mais eficazes na identificação e diferenciação do patógeno em amostras clínicas ou isolados de meios de cultura.

Enquanto a identificação de micobactérias por prova bioquímica é lenta, resultados são obtidos mais rapidamente com a utilização da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação de genes específicos de *Mycobacterium* spp. e posterior análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). Além disso, a quantidade de micobactérias necessárias para identificação pelas técnicas moleculares é inferior, aumentando consideravelmente a sensibilidade do diagnóstico. No entanto, sua aplicação na rotina dos laboratórios ainda é bastante restrita devido ao elevado custo de seus insumos e ao alto grau técnico exigido. (RUGGIERO *et al*, 2007).

1.3.5 Diagnóstico Alérgico-Cutâneo (PPD)

O diagnóstico alérgico-cutâneo através da tuberculina é a principal ferramenta da maioria dos programas de erradicação de tuberculose no mundo, inclusive do PNCEBT. Este método é aceito pelas organizações internacionais e está de acordo com o Código Zoossanitário Internacional da OIE. (BRASIL. MAPA, 2006).

A tuberculina atualmente utilizada pelos programas mundiais de controle e erradicação da tuberculose foi desenvolvida por Seibert, em 1934, em substituição à tuberculina originalmente criada por Robert Koch, em 1890. Conhecida como PPD (derivado de proteínas purificadas), é composta por proteínas separadas do meio de cultivo de *M. bovis* (cepa AN5) e de *M. avium* (cepa D4) por precipitação, as quais são purificadas por lavagens com ácidos e fosfatos e diluídas nas concentrações de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL para o PPD bovino e aviário, respectivamente. Nos dois casos, cada dose equivale ao volume de 0,1 mL. Estas condições são definidas pelas normas de produção das tuberculinas bovinas estabelecidas tanto pela OIE quanto pelo MAPA. (OIE, 2009; BRASIL. MAPA, 2006).

O diagnóstico se dá pela medição da reação alérgica frente à aplicação da tuberculina. Após a inoculação, as proteínas são fagocitadas e processadas, tendo seus peptídeos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) do tipo II na superfície celular de macrófagos. Estes antígenos são reconhecidos então por linfócitos T sensibilizados (geralmente CD4⁺ Th1), os quais

passam a produzir citocinas que ativam células endoteliais venulares e convertem os monócitos em macrófagos ativados capazes de eliminar o antígeno. A consequência final destas reações é a reação alérgica propriamente dita, classificada como hipersensibilidade retardada do tipo IV, cuja medição permite o diagnóstico.

Em animais não infectados, não ocorre nenhuma resposta significativa no ponto de aplicação. Em animais infectados, portanto sensibilizados para a tuberculina, forma-se um endurecimento e edema progressivo no local de inoculação, o qual se desenvolve até 72 horas após aplicação. Após este período, o tamanho da reação começa a diminuir, até desaparecer. Em casos de hipersensibilidade, a lesão pode evoluir até uma necrose no ponto de aplicação, acompanhada por vesícula e enduração características. O PPD é capaz de diagnosticar infecções a partir de três a oito semanas. (BRASIL. MAPA, 2006).

Para diagnóstico indireto de tuberculose, os métodos oficiais são o teste cervical simples (TCS), o teste da prega caudal (TPC) e o teste cervical comparativo (TCC).

O teste cervical simples constitui a prova de rotina em gado de leite. A aplicação do PPD é realizada na região cervical ou escapular do animal, sempre do mesmo lado em todos os animais testados na propriedade. A leitura e a interpretação são realizadas comparando-se a espessura da dobra da pele antes e depois da inoculação da tuberculina bovina (ΔB) (QUADRO 1).

ΔB (mm)	Sensibilidade	Consistência	Outras	Interpretação
0,0 a 1,9	-	-	-	Negativo
2,0 a 3,9	Pouca dor	Endurecida	Delimitada	Inconclusivo
2,0 a 3,9	Muita dor	Macia	Necrose	Positivo
> 4,0	-	-	-	Positivo

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DO TESTE CERVICAL SIMPLES

FONTE: EMBRAPA (2009)

NOTA: O valor de ΔB corresponde à diferença da espessura da dobra da pele do animal antes e depois da aplicação do teste.

O teste da prega caudal pode ser utilizado como prova de triagem exclusivamente em gado de corte. A aplicação do PPD é realizada de seis a dez centímetros da base da cauda, na junção das peles pilosa e glabra, em um dos lados. A leitura é realizada comparando-se a prega inoculada com a prega do lado oposto. Qualquer aumento de espessura já classifica o animal como reagente positivo.

O teste cervical comparativo é considerado como prova confirmatória para animais reagentes inconclusivos em um dos testes anteriores. Também é utilizado como prova única para diagnóstico em rebanhos com histórico de reações inespecíficas, pois apresenta maior especificidade em relação ao Teste Cervical Simples. É executado de forma similar ao teste cervical simples: aplicam-se as duas tuberculinas na região cervical ou escapular, sendo o PPD aviário na porção cranial e o PPD bovino na porção caudal, com 15 a 20 centímetros entre as injeções. A leitura também é realizada pela diferença entre a espessura da dobra depois da inoculação em relação à espessura antes da aplicação. A interpretação do resultado é feita com base na diferença aritmética entre a variação da espessura das dobras no PPD bovino (ΔB) e a variação da espessura das dobras do PPD aviário (ΔA) (QUADRO 2).

	$\Delta B - \Delta A$ (mm)	Interpretação
$\Delta B < 2,0$	-	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	Negativo
$\Delta B \geq \Delta A$	0,0 a 1,9	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	2,0 a 3,9	Inconclusivo
$\Delta B > \Delta A$	$\geq 4,0$	Positivo

QUADRO 2 - CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DO TESTE CERVICAL COMPARATIVO

FONTE: EMBRAPA (2009)

NOTA: O valor de ΔB corresponde à diferença da espessura da dobra da pele do animal antes e depois da aplicação do teste tuberculínico bovino, e o valor de ΔA no teste tuberculínico aviário.

Em caso de resposta inconclusiva nos testes cervical simples ou da prega caudal, o animal pode passar pelo teste confirmatório (TCC) após 60 a 90 dias do primeiro teste, ou então ser considerado infectado e ser encaminhado ao descarte.

Apesar da sintonia entre os procedimentos adotados com as exigências internacionais, o MAPA incentiva o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos e pretende atualizar os atualmente disponíveis. (BRASIL. MAPA, 2006).

1.4 PESQUISAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS DIAGNÓSTICOS PARA TUBERCULOSE BOVINA

1.4.1 Limitações do diagnóstico por PPD

Embora o PPD seja a principal ferramenta da maioria dos programas de controle e erradicação de tuberculose em vários países, esta metodologia tem mostrado sensibilidade insuficiente. Segundo relato de Rua-Domenech (2006), os testes simples (cervical e caudal) apresentam sensibilidade média de 83,9%, enquanto o teste cervical comparativo apresenta sensibilidade média de 80% a 93%, dependendo dos critérios utilizados para diagnóstico.

Alguns fatores levam à redução da sensibilidade do PPD, por exemplo, o fenômeno conhecido como “dessensibilização”. A aplicação da tuberculina no animal influencia seu sistema imunológico de tal forma que este passa a não responder a novos diagnósticos realizados em períodos de até 60 dias. Por este motivo, a confirmação de resultados inconclusivos ou duvidosos só pode ser realizada por novo teste intradérmico após 60 a 90 dias. Neste período de espera, o produtor poderia optar por isolar o animal, embora esta prática não garanta a proteção do restante do rebanho. Na prática, o produtor geralmente acaba eliminando o animal, levando a perdas econômicas.

O diagnóstico alérgico-cutâneo também não é capaz de identificar infecções recentes. Até a sexta semana após infecção, a resposta imune celular no animal pode não ter sido completamente ativada, levando a diagnósticos falso-negativos. Mesmo assim, o animal já é capaz de transmitir a doença a outros animais. Conseqüentemente, mesmo em regiões monitoradas pelo uso do PPD, novos focos de infecção por tuberculose bovina podem surgir.

Um terceiro fator que leva à redução da sensibilidade do teste alérgico-cutâneo é conhecido como estado de anergia. Em estados crônicos da infecção, o sistema imunológico passa a não diferenciar os antígenos da tuberculina e promover a reação alérgica, o que leva a resultados falso-negativos. O mesmo estado pode ocorrer em função de condições de estresse ou subnutrição. Infecções virais que debilizem o sistema imunológico, mais especificamente na etapa de sinalização realizada pelos macrófagos, também levam a quadros de anergia. Este tipo de

infecção é provocado por vírus endêmicos no Brasil, a exemplo do vírus da diarreia viral bovina (BVD). (DE LA RUA-DOMENECH *et al.*, 2006).

Em alguns casos, a especificidade do teste intradérmico também se mostra insuficiente, principalmente em regiões com histórico de reações falso-positivas, devido à contaminação cruzada com micobactérias ambientais. Este é um dos motivos que dificultam a eliminação da tuberculose bovina em países já na fase final de seus programas de controle e erradicação da tuberculose, a exemplo da Austrália. O mesmo relato citado anteriormente aponta especificidade média de 96,8% para os testes simples e 99,5% para o teste comparativo. Estes valores apresentam grande variação, pois dependem dos critérios utilizados para caracterizar animais reatores positivos, por exemplo, o nível de corte. Considerando que os testes simples são utilizados como prova de rotina, nestas regiões com elevado nível de reações inespecíficas a especificidade de 96,8% leva ao abate de animais falso-positivos, e conseqüente perda econômica. Além disso, insere-se um erro no levantamento epidemiológico. Nestas regiões, o teste comparativo é o mais indicado, porém torna o processo de diagnóstico mais custoso.

Outra limitação ocasionada pelo uso do PPD provém da reação falso-positiva quando aplicado em animais vacinados com a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Grande parte dos antígenos presentes no PPD também está presente na cepa atenuada de *M. bovis* utilizada na vacina. Conseqüentemente, a utilização desta ferramenta, que auxiliaria na prevenção da infecção ou na atenuação da patologia, fica comprometida e deixa de ser aplicável pela maioria dos programas de controle e erradicação da tuberculose bovina.

1.4.2 Novas propostas para contornar a falta de sensibilidade e de especificidade do diagnóstico por PPD.

A metodologia do ensaio de interferon gama (IFN- γ) tornou-se uma alternativa ao teste tuberculínico por também se tratar de um diagnóstico de resposta celular.

Esta metodologia pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, amostras de sangue coletadas dos animais são heparinizadas e enviadas rapidamente a laboratórios, onde são incubadas a 37°C na presença dos antígenos de tuberculose entre 16 e 24 horas. Os antígenos regularmente utilizados são os próprios PPD bovino e aviário, além de um controle negativo, todos separadamente. Na segunda

etapa é realizada a quantificação do interferon gama produzido através de metodologias usando técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) comercialmente disponíveis. A produção da citocina pelos linfócitos T se dá como resposta à infecção pela micobactéria, similarmente ao que ocorre naturalmente no organismo infectado. O diagnóstico é dado em função dessa quantidade de interferon detectada. (OIE, 2009).

O teste de IFN- γ é bastante similar ao teste tuberculínico cervical comparativo (TCC), pois avalia a proporção entre as respostas a antígenos do *M. bovis* (PPD bovino) e antígenos inespecíficos (PPD aviário). No entanto, principalmente por não depender do aparecimento de uma reação alérgica como acontece com a tuberculínica, o teste de IFN- γ é capaz de diagnosticar os animais mais rapidamente e com tempo de infecção menor, entre 1 a 4 semanas após infecção. Segundo Rua-Domenech (2006), o teste de IFN- γ possui sensibilidade de 87,6% e especificidade de 96,6%.

Alguns autores defendem que esta metodologia é aplicável em grandes rebanhos, e tem como principais vantagens a elevada sensibilidade e a possibilidade de reteste com resultados em 24 horas, sem comprometer o sistema imunológico do animal. (WOOD *et al.*, 2002). Contudo, é evidente a dependência desta metodologia a laboratórios preparados e com qualidade técnica, exigências nem sempre disponíveis em países emergentes. Além disso, a amostra de sangue coletada deve ser analisada em até 8 horas, o que também dificulta a utilização do método em muitas propriedades.

Os resultados obtidos pelo teste de IFN- γ podem ser subestimados em amostras provenientes de animais com resposta celular debilitada, seja por estresse ou em condições de anergia. Além disso, mesmo com esta metodologia ainda se observa uma especificidade insuficiente.

A principal proposta para contornar a falta de especificidade dos diagnósticos de tuberculose reside na utilização dos chamados antígenos definidos. Estes consistem em antígenos purificados exclusivos de *M. bovis*, utilizados isoladamente ou em combinação, que são produzidos pelas micobactérias. No PPD convencional, eles se encontram em diferentes concentrações e estão junto a outros antígenos produzidos tanto por micobactérias quanto por outras espécies, como *Nocardia* sp. Desta forma, tem-se uma possibilidade menor de reações cruzadas com outras doenças.

Por muito tempo acreditou-se que a grande quantidade e variedade de antígenos presentes no PPD era necessária para a ativação das células apresentadoras de antígenos e conseqüente produção dos diversos MHCs integrantes da resposta celular. Entretanto, observa-se que a utilização de uma variedade menor de antígenos em concentrações e combinações mais bem definidas também leva à exposição de diferentes MHCs. (VORDERMEIER *et al.*, 2001).

Em estudo comparativo realizado por Wood e colaboradores (2002), um teste ELISA utilizando antígeno purificado MPB-70 mostrou ter sensibilidade de apenas 18,1% e especificidade de 96,4%, enquanto o teste caudal simples apresentou sensibilidade de 68,1% e especificidade de 96,7%. Já o teste IFN- γ também utilizando o antígeno MPB-70 apresentou uma sensibilidade de 81,8% e especificidade de 99,1%.

A baixa sensibilidade obtida pelo método ELISA citado exemplifica a predominância da resposta celular frente à infecção por micobactérias. Sabe-se, contudo, que a tuberculinização aumenta a resposta humoral em animais positivos. Além disso, a resposta celular torna-se fraca na fase crônica da doença, enquanto a resposta humoral prevalece (FIGURA 7). De posse desta informação, alguns métodos para diagnóstico de tuberculose buscando resposta humoral em animais anérgicos ao PPD têm sido propostos. (WOOD; ROTHEL, 1994).

Em 2004, Lim e colaboradores relataram o isolamento de proteínas do filtrado de cultura de *M. tuberculosis*, purificadas através de cromatografia de troca iônica, as quais apresentaram alta capacidade de indução de resposta celular. Os autores destacaram o potencial para aplicação como antígenos de vacina de sub-unidade para tuberculose.

Malaghini (2008) e Malaghini *et al.* (2011) demonstraram o uso potencial dos antígenos CFP-10, ESAT-6 e MTSP-11 para diagnóstico de tuberculose humana. Os antígenos foram reconhecidos por anticorpos em soros de coelhos hiper-imunizados em ensaios do tipo ELISA. Também apresentaram resposta inflamatória via intradermorreação em cobaios sensibilizados com *M. tuberculosis*, com resposta equivalente ao PPD humano RT23. (MALAGHINI, 2008; MALAGHINI *et al.*, 2011).

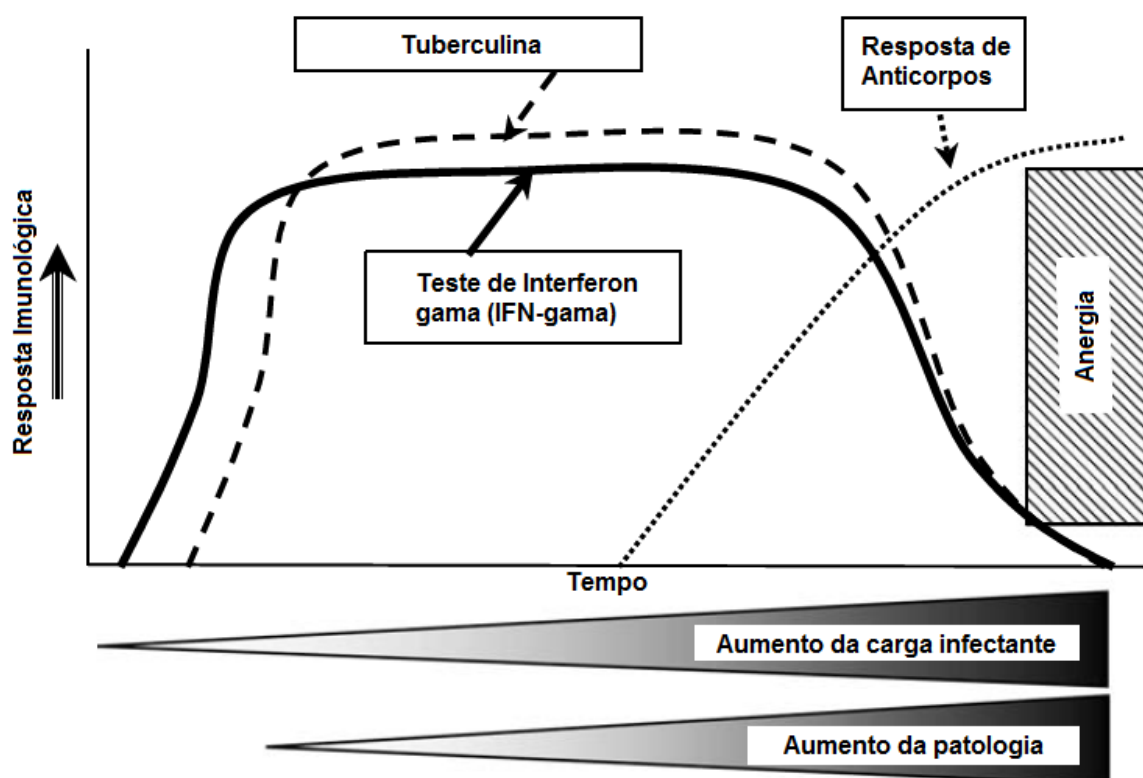


FIGURA 7 - ESPECTRO DE RESPOSTAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO BOVINO FRENTE À INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS
 FONTE: DE LA RUA-DOMENECH (2006)

1.4.3 Aplicação de diagnósticos diferenciais

Alguns países como Reino Unido e Nova Zelândia concluíram que a melhor conduta para controle em longo prazo da tuberculose bovina em suas regiões é através do uso de vacinas. Apesar de novas vacinas estarem em fases de teste, até o momento nenhuma apresentou capacidade de proteção superior à BCG, produzida com uma cepa atenuada de *M. bovis*.

O PPD convencional, independente da metodologia empregada, tem forte reação cruzada com antígenos presentes na BCG. Desta forma, a utilização da vacina compromete em muito o uso do diagnóstico de tuberculose por reação intradérmica, seja em humanos ou bovinos. O desenvolvimento de diagnósticos capazes de diferenciar as respostas provenientes de infecções daquelas provenientes dos antígenos vacinais tornou-se uma condição necessária à implantação de qualquer programa de vacinação baseado no uso da BCG ou

vacinas similares. (VORDERMEIER *et al.*, 2001). Esta característica é conhecida como DIVA (diferenciação de animais infectados e vacinados).

Os antígenos ESAT-6 e CFP-10, pertencentes ao complexo de antígenos de *M. tuberculosis*, são muito utilizados como reagentes para diferenciar infecção pela doença de indivíduos vacinados (DIVA) para tuberculose humana e bovina. (WHELAN *et al.*, 2010).

ESAT-6 é um antígeno proveniente do filtrado de cultivos de curto tempo de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*. Estudos mostram que este antígeno é capaz de diferenciar respostas devido à infecção por *M. bovis* daquela devido à micobactérias ambientais, denominada resposta inespecífica. (VORDERMEIER *et al.*, 2001).

Assim como a ESAT-6, o antígeno CFP-10 também é encontrado em frações de baixo massa molecular de filtrados de culturas de micobactérias. Os genes que codificam as proteínas ESAT-6 e CFP-10 são adjacentes no genoma da micobactérias, e por isso são transcritos simultaneamente. Também apresentam certa homologia em sua sequência de DNA, pertencendo ao mesmo grupo de pequenas proteínas de micobactérias chamadas de Família ESAT-6. (VORDERMEIER *et al.*, 2001). Os genes que os codificam estão presentes na região de diferenciação 1 (RD1), a qual foi deletada em todas as cepas BCG. (WHELAN *et al.*, 2010). Por isso, estes antígenos são capazes de realizar o diagnóstico diferencial, tanto em humanos quanto em bovinos.

A CFP-10 é reconhecida em uma grande quantidade de bovinos infectados. Em humanos, estudos da aplicabilidade desta proteína como metodologia DIVA apontam frequências de resposta entre 50 – 90%. Já para o antígeno ESAT-6, este intervalo é de 60 a 95%. (VORDERMEIER *et al.*, 2001).

Apesar do teste de IFN- γ ser a metodologia mais utilizada aplicando antígenos capazes de diferenciar doença de reação vacinal, o teste intradérmico consiste em uma excelente plataforma de utilização por sua ampla aplicação e familiaridade por parte de veterinários e técnicos. Esta plataforma tem especial importância em regiões com difícil acesso a laboratórios e insumos.

Whelan e colaboradores (2010) testaram por via intradérmica um coquetel composto por quatro proteínas capazes de realizar a diferenciação de respostas, ESAT-6, CFP-10, MPB70 e MPB83, sendo cada dose composta por apenas 10 μ g de cada antígeno. Foi demonstrado que as quatro proteínas não geraram respostas

falso-positivas em animais vacinados com BCG ou animais sensibilizados com micobactérias ambientais. Enquanto o teste cervical comparativo apresentou sensibilidade de 94,1% e especificidade de 40,0%, o coquetel composto pelas quatro proteínas apresentou sensibilidade de 73,6% e especificidade de 100%. O mesmo grupo ainda demonstrou um aumento de sensibilidade para 77% com a utilização de mais um antígeno, o Rv3615c.

Uma nova linha de antígenos tem surgido nos últimos anos através do aprimoramento da bioinformática e da tecnologia de síntese química de peptídeos. O uso de peptídeos sintéticos tem a vantagem de um menor custo de produção e mais fácil padronização e controle de qualidade, além de não promover riscos de infecção por serem quimicamente sintetizados. Além disso, não oferecem risco de reação alérgica à endotoxinas, freqüentemente presentes em proteínas recombinantes produzidas em algumas bactérias como *E. coli*. (VORDERMEIER *et al.*, 2001).

O uso combinado de ESAT-6 e CFP-10 recombinantes por Van Pinxteren e colaboradores (2001) obteve uma sensibilidade de 75%, enquanto o uso do coquetel de peptídeos derivados destes mesmos antígenos obteve uma sensibilidade de 77,9%.

A melhora da sensibilidade dos testes que utilizam antígenos definidos é necessária para implantação deste tipo de tecnologia em programas de controle e erradicação de tuberculose bovina baseados em detecção e abate. Para isso, doses mais elevadas (a partir de 400ug) ou a adição de imunomoduladores podem ser necessários. (WHELAN *et al.*, 2010).

Difícilmente antígenos isolados serão reconhecidos por todos os animais infectados, destacando-se a importância das combinações de antígenos. Cada antígeno seria reconhecido por um grupo de animais em fases diferentes da infecção. Além disso, a combinações de antígenos reduzem a possibilidade de seleção dos mutantes não produtores de um antígeno específico. (VORDERMEIER *et al.*, 2001).

Ainda destaca-se que é necessária uma fase inicial, a qual recruta células T antígeno-específicas no decorrer da hipersensibilidade retardada. Apenas após esta fase, dá-se início à resposta inflamatória clássica. Alguns antígenos podem não estar diretamente relacionados a esta última etapa, e por tanto não tem alta capacidade de indução de IFN- γ . Contudo, podem estar relacionados às etapas iniciais, e por isso aumentam fortemente a sensibilidade e a intensidade das

respostas obtidas por antígenos como ESAT-6 e CFP-10. Desta forma, combinações de antígenos geralmente demonstram melhores resultados do que aqueles obtidos por antígenos isolados.

Métodos de altíssima sensibilidade, mesmo que com menor especificidade, são úteis em campanhas de erradicação em regiões de baixa incidência de tuberculose, pois a chance de um animal infectado não ser identificado é menor, evitando o aparecimento de um novo foco de infecção.

1.5 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

1.5.1 Expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*

A expressão de proteínas heterólogas consiste na produção de uma proteína de interesse por um organismo diferente do original. Tem como uma de suas principais ferramentas o DNA recombinante, composto do gene codificante da proteína de interesse (inserto) associado a uma molécula maior de DNA (vetor). Este DNA recombinante então é introduzido numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação, gerando a chamada célula transformada.

A bactéria *Escherichia coli* é certamente o microrganismo mais bem estudado e conhecido da atualidade. Esta bactéria, que até a primeira metade do século passado só tinha importância pelo seu aspecto patológico, tornou-se hoje de suma importância na pesquisa básica e aplicação industrial. (BUSTAMANTE FILHO, 2010).

A elucidação de seu material genético, bem como de seus sistemas metabólicos, foram alvo de estudo e ajudaram no desenvolvimento de ferramentas importantes de biologia molecular, engenharia genética e metabólica. Não por menos, a *E. coli* é também o microrganismo mais utilizado na expressão de proteínas heterólogas para diversas aplicações, desde proteínas para sequenciamento e caracterização até produção industrial de enzimas e produtos farmacológicos. (CHAVES, 2009).

A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* apresenta algumas vantagens. As células possuem alta taxa de crescimento em meios de cultivo de baixo custo. Também permite altos rendimentos de produção e direcionamento das

proteínas recombinantes para compartimentos específicos, como periplasma e membrana celular. Contudo, este sistema não permite modificações pós-traducionais, muitas vezes importantes em antígenos. As proteínas produzidas neste sistema são geralmente armazenadas em agregados insolúveis no interior das células, os chamados corpos de inclusão, que necessitam de processos específicos de purificação e reativação.

1.5.2 Sistema de expressão, vetor e inserto

Um sistema de expressão bastante utilizado para expressão de proteínas recombinantes consiste numa cepa modificada de *E. coli* denominada BL21 pLysS, não patogênica, com algumas características que favorecem a produção de proteínas recombinantes. É naturalmente resistente a cloranfenicol, que pode ser usado como agente de pressão seletiva. Assim, apenas células resistentes a este antibiótico são capazes de crescer em sua presença. A cepa ainda apresenta o plasmídeo pLysS, que garante que a produção do gene recombinante só ocorra na presença do agente indutor específico, no caso o tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG). Esta característica pode ser fundamental, por exemplo, na expressão de proteínas tóxicas à célula, onde a expressão durante a fase de crescimento celular é prejudicial.

O vetor pDest17 é largamente aplicado em estudos de expressão de proteínas devido as suas propriedades (FIGURA 8). Ele possui o promotor T7, capaz de produzir grande quantidade de proteína através do uso do indutor IPTG, uma versão sintética da sacarose.

Também possui a sequência genética capaz de fusionar à proteína de interesse uma cauda de 6 resíduos de histidina. Esta cauda apresenta grande afinidade a metais como níquel e cobalto. Desta forma, resinas cromatográficas que contenham estes metais podem ser utilizadas como processos de purificação por cromatografia de afinidade, facilitando a separação destas proteínas recombinantes das demais.

Outra característica do pDest17 é a presença da sequência que confere resistência à ampicilina. Isto permite a manutenção de uma pressão seletiva do sistema de produção, pois apenas microrganismos resistentes a este antibiótico serão capazes de crescer. Em outras palavras, somado à resistência natural da

cepa bacteriana utilizada, apenas as células *E. coli* BL21 pLysS portadoras do plasmídeo recombinante serão capazes de suportar as pressões seletivas da utilização simultânea dos antibióticos cloranfenicol e ampicilina.

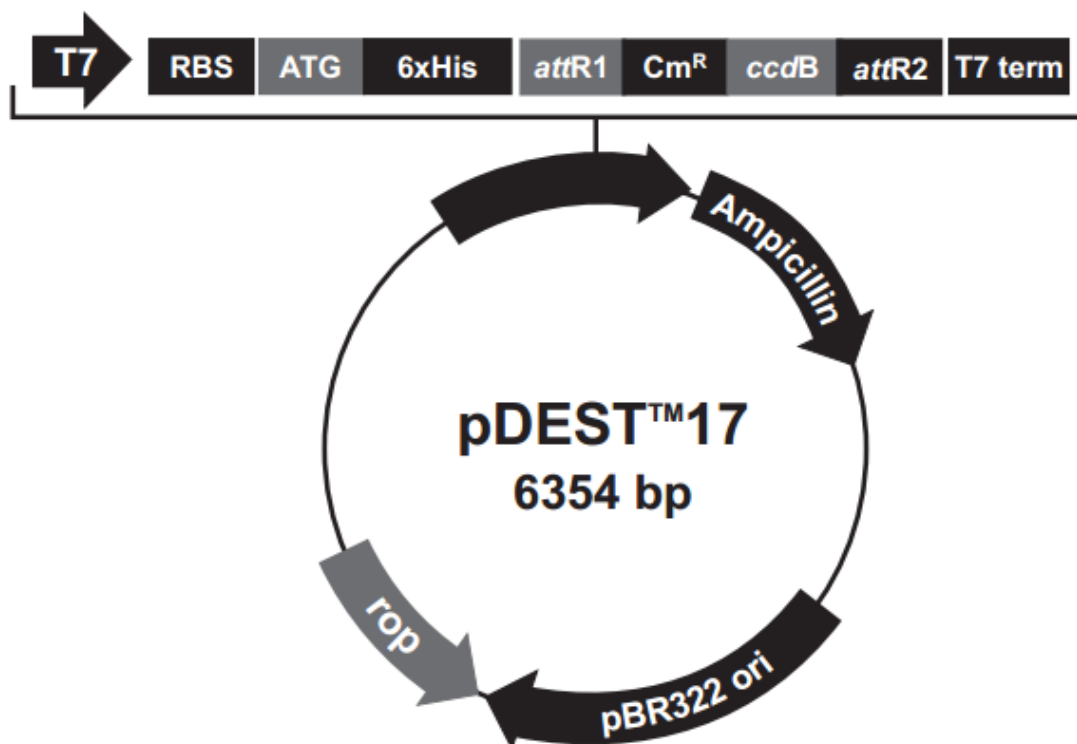


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DO PLASMÍDEO PDEST17

FONTE: INVITROGEN (2003)

NOTA: T7 = sítio promotor T7, RBS = sítio de ligação de ribossomos, ATG = códom de iniciação ATG, 6xHis = sequência codificante de seis resíduos consecutivos de histidina, attR1 e attR2 = sítios de recombinação específica, Cm^R = gene de resistência a cloranfenicol, ccdB = gene para proteína ccdB, T7 term = região de terminação de transcrição T7, Ampicillin = gene de resistência a ampicilina, pBR322 ori = sítio de origem de replicação, rop = quadro de leitura aberto.

O pDest17 permite que o inserto em questão, o qual estará inserido no lugar das regiões Cm^R e ccdB, seja expresso pela célula hospedeira com sucesso. O gene ccdB codifica para uma proteína inibitória da enzima DNA girasse da *E. coli*, de tal forma a inibir o crescimento celular. Durante a etapa de inserção do gene recombinante no plasmídeo, este gene é removido. Consequentemente, o gene ccdB age como fator de seleção negativa, inibindo o crescimento das células onde este gene não tenha sido substituído pelo inserto. Este controle é importante para garantir a montagem correta do plasmídeo contendo o gene recombinante. (MALAGHINI, 2008).

1.5.3 Vantagens da produção de antígenos por via recombinante

A produção de antígenos por via recombinante oferece vantagens sobre outros sistemas. A produção dos antígenos pelo cultivo da própria micobactéria, modelo utilizado na produção do PPD atual, é bastante complexa. Este microrganismo tem ritmo de crescimento lento em meios específicos, com tempo de incubação de 8 a 12 semanas, enquanto as células de *E. coli* crescem em períodos inferiores a 24 horas em meios simples e de baixo custo.

Além disso, é possível super-expressar o gene de interesse, aumentando consideravelmente a proporção da proteína recombinante em relação às demais proteínas. Esta expressão intensa facilita a purificação e melhora os rendimentos de produção. É factível também a fusão dos peptídeos com os resíduos de histidina, permitindo a utilização de etapas de purificação de grande eficiência, como a cromatografia de afinidade.

Outra vantagem no presente caso é a redução do risco biológico imposto pelo sistema de produção. *M. tuberculosis* e o *M. bovis* são microrganismos de classe de risco 3, e por isso a produção convencional de seus antígenos necessita de estrutura física especial e altos investimentos. Já a *E. coli*, mesmo sendo organismo geneticamente modificado (OGM), é de classe de risco 2, o que permite maior flexibilidade da unidade de produção e estrutura mais simples. O alto nível de biossegurança exigido na estrutura física e nos procedimentos operacionais é crucial à indústria, e pode inviabilizar a produção de um insumo. Estas classificações foram determinadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, em acordo com normas internacionais de biossegurança.

A síntese química é mais uma opção na produção de antígenos. As grandes vantagens desta metodologia são a simplicidade do processo e a possibilidade de automatização, levando a produtos com elevado grau de pureza e facilidade de controle de qualidade. Contudo, apenas alguns aminoácidos podem ser inseridos durante a formação do polímero, limitando o tamanho do produto ao nível de peptídeos. Outras restrições são os elevados custos de implantação e dos insumos. Ainda assim, o avanço das tecnologias de síntese química de peptídeos e da bioinformática tem aumentado o uso potencial desta metodologia em escala industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral produzir e purificar as proteínas ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11, por engenharia genética, para diagnóstico de tuberculose bovina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- amplificar plasmídeos contendo o gene para as proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6 e MTSP-11;
- produzir pré-inóculos de *E. coli* contendo plasmídeos codificantes de cada proteína;
- produzir as proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6 e MTSP-11 por fermentação em agitadores de bancada, nos volumes de 1 litro, utilizando o meio LB;
- purificar as proteínas recombinantes através de metodologias simplificadas e aplicáveis industrialmente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A primeira etapa do presente trabalho consistiu na criação de um banco de cepas *E. coli* quimiocompetentes para posterior amplificação dos plasmídeos e expressão das proteínas. Com maior quantidade de plasmídeos, a próxima etapa foi a produção dos pré-inóculos, avaliando-se as melhores condições de estocagem e quantidade de células presentes.

A seguir, deu-se início ao processo de otimização da expressão das proteínas recombinantes. Primeiramente foi determinada a concentração ideal de agente indutor (IPTG). A condição ótima foi então utilizada para produção das proteínas recombinantes através de fermentação realizada em agitadores de bancada (*shaker*) em volumes de 1 litro.

Após a etapa de fermentação, iniciou-se o processo de purificação. A separação da biomassa foi realizada por centrifugação, pois as proteínas recombinantes são acumuladas no interior das células, na forma de corpos de inclusão. Em seguida, a biomassa foi ressuspensa em tampão adequado e foi realizada a etapa de sonicação para liberação dos corpos de inclusão e posterior solubilização em solução com uréia 6 M. A próxima etapa consistiu na cromatografia de afinidade em coluna de níquel para capturar as proteínas recombinantes, separando-as das demais. Após eluição, as soluções proteicas foram ultrafiltradas em membrana de 3,5 kDa para troca de tampão e correção da concentração para 1 mg/mL (FIGURA 9).

3.1 LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular utilizada para amplificação dos plasmídeos foi a *E. coli* DH5alpha, cedida pelo Instituto Carlos Chagas da cidade de Curitiba, Paraná. A cepa utilizada para produção das proteínas recombinantes foi a *E. coli* BL21 pLysS, também cedida pelo Instituto Carlos Chagas.

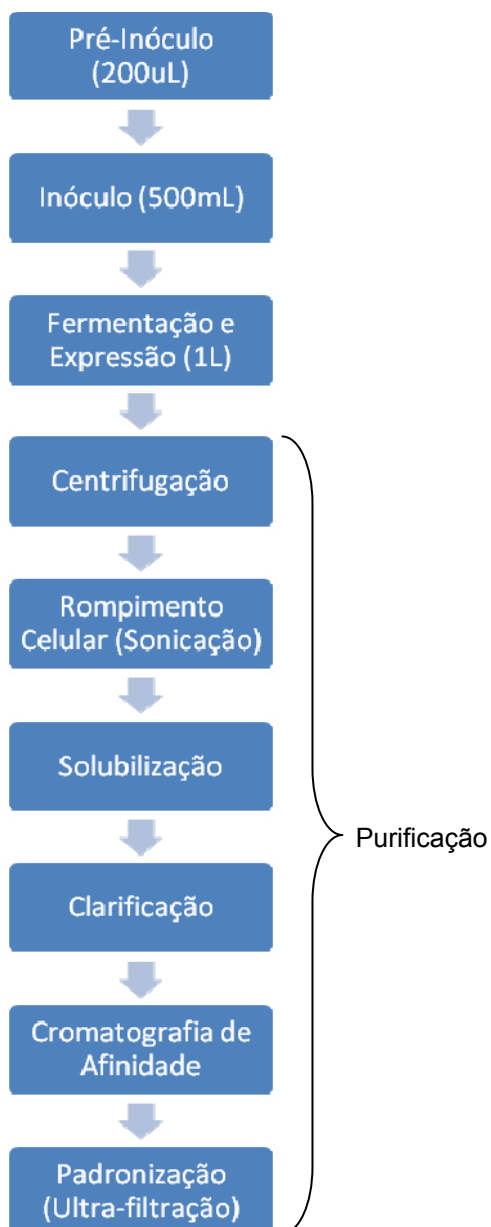


FIGURA 9 – ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

FONTE: O autor (2012)

3.2 PLASMÍDEOS

O plasmídeos contendo os genes para as proteínas ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11 foram desenvolvidos por Malaghini (2008) e fornecidos pela Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol, do Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. As sequências nucleotídicas dos insertos clonados encontram-se no ANEXO 1.

3.3 PREPARO DE MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES

3.3.1 Meio Luria-Bertani (LB)

O meio LB foi preparado diluindo-se 25 g do meio em pó (Sigma-Aldrich L3152) em um litro de água ultrapura. O meio foi então esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

O meio LB ágar foi preparado adicionando-se 20 g de ágar bacteriológico por litro de meio LB e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Para plaqueamento, o meio LB ágar foi fundido em micro-ondas e transferido para placas de Petri previamente esterilizadas.

O meio LB seletivo foi elaborado adicionando-se a solução estoque do antibiótico previamente filtrada ao meio LB esterilizado em temperatura ambiente, sempre no momento do uso. Para o meio LB ágar seletivo, a adição dos antibióticos se deu após fundição do meio sólido e resfriamento, momento antes deste ser plaqueado.

3.3.2 Solução Estoque de Ampicilina e Cloranfenicol

A solução estoque de ampicilina foi preparada por solubilização de 1 g de ampicilina sódica em 10 mL de água destilada. A solução estoque de cloranfenicol foi preparada por solubilização de 250 mg de cloranfenicol em 10 mL de etanol 70%. As soluções foram esterilizadas em filtros de 0,22 µm, em fluxo laminar, aliqüotadas em tubos esterilizados pré-identificados e mantidas a - 20°C até o momento do uso.

3.4 PARÂMETROS CINÉTICOS

A determinação da concentração celular bacteriana foi feita de forma indireta por medição da absorbância do meio de cultivo, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Segundo Lima (2004), para cultivos de *E. coli* recombinantes, 1,0 unidade de absorbância em 600 nm equivale a uma concentração celular de 0,35 g/L, em base seca.

Dois parâmetros cinéticos foram utilizados para avaliação do crescimento celular bacteriano: velocidade específica de crescimento μ (FÓRMULA 1); e velocidade de crescimento dx/dt (FÓRMULA 2).

$$\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / t - t_0 \quad (1)$$

$$dx/dt = \mu \cdot x_t \quad (2)$$

onde: μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

x_t = concentração celular no tempo t em base seca (g/L)

x_0 = concentração celular inicial em base seca (g/L)

t = tempo final (h)

t_0 = tempo inicial (h)

dx/dt = velocidade de crescimento (g/L.h)

3.5 PRODUÇÃO DE BANCO DE CÉLULAS *E. coli* QUIMIOCOMPETENTES

Para amplificação dos plasmídeos e posterior produção das proteínas recombinantes foi necessária a criação de um estoque de células *E. coli* DH5alpha e *E. coli* BL21 pLysS quimiocompetentes.

Para cada uma das duas cepas, dez colônias frescas foram inoculadas em 20 mL de meio LB seletivo em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram incubados a 37°C e 200 rpm por aproximadamente 4 horas, até atingir absorbância de 0,5 em espectrofotômetro (578 nm). A seguir, o volume foi transferido para um tubo de centrifugação de 50 mL, pré-resfriado em gelo, e centrifugado a 3.000 xg e 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 20 mL de solução de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 0,1 M pré-resfriada em gelo. Após agitação leve, por inversão durante 1 minuto, o tubo foi novamente centrifugado a 3.000 xg e 4°C por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 20 mL de solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,1 M pré-resfriada em gelo, homogeneizado por inversão por 1 minuto e incubado a 4°C por 30 minutos, com agitação eventual. O tubo foi então centrifugado a 3.000 xg e 4°C por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,1 M pré-resfriada, e adicionou-se ao tubo 100 μ L de glicerol esterilizado. Após

homogeneização, alíquotas de 100 uL devidamente identificadas foram armazenadas a - 80°C.

O procedimento utilizado foi o mesmo para os dois casos, com exceção do antibiótico utilizado no meio LB seletivo. Para a cepa *E. coli* BL21 pLysS, o meio LB utilizado continha 25 mg/L de cloranfenicol. Para a cepa *E. coli* DH5alpha, o meio LB utilizado continha 100 mg/L de ampicilina sódica.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Para amplificação dos plasmídeos foi utilizado o kit comercial QIAGEN® Maxi Plasmid Kit, seguindo-se protocolo fornecido pelo fabricante. (QIAGEN, 2009). Foi purificado apenas um plasmídeo por vez, um para cada uma das proteínas CFP-10, ESAT-6 e MTSP-11, para evitar contaminação cruzada.

A primeira etapa consistiu no processo de transformação de células *E. coli* DH5alpha com o plasmídeo em questão, através do processo de choque térmico (FIGURA 10). Foram preparadas duas placas de Petri com meio LB ágar acrescido de ampicilina 100 mg/L. Uma alíquota de 100 uL de *E. coli* DH5alpha quimiocompetente, obtida conforme descrito no item 3.5, foi descongelada em gelo por 20 minutos, assim como uma alíquota do plasmídeo em questão. Ao microtubo com a *E. coli* foram adicionados 10 uL da solução contendo os plasmídeos, homogeneizado e mantido em gelo por 30 minutos. O microtubo foi então incubado em banho-maria aquecido a 42°C por 90 segundos e retornado ao gelo por mais 2 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio LB sem antibiótico, sendo o volume transferido para um tubo de 15 mL e incubado a 37°C e 200 rpm por duas horas. Em seguida, volumes de 50 e 100 uL do fermentado foram plaqueados pelo método de superfície em placas de Petri com meio seletivo, que foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas até crescimento das colônias.

Aproximadamente 10 colônias foram então inoculadas em 2 mL de meio LB seletivo (ampicilina 100 mg/L) contidos em tubos de centrifugação de 50 mL, e incubados a 37°C e 200 rpm por 8 horas. Em seguida, 200 uL do fermentado foram adicionados em 100 mL de meio LB seletivo (ampicilina 100 mg/L) contidos em frasco Erlenmeyer de 500 mL e incubados a 37°C e 200 rpm por aproximadamente 16 horas.

O fermentado foi centrifugado a 6.000 xg e 4°C por 15 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 10 mL do tampão P1 do kit (Tampão de Ressuspensão) e em seguida adicionado 10 mL do tampão P2 do kit (Tampão de Lise). O volume foi homogeneizado vigorosamente por inversão 5 vezes e incubado a 25°C por 5 minutos. Então, adicionou-se 10 mL do tampão P3 (Tampão de Neutralização) pré-resfriado em gelo, imediatamente homogeneizado por inversão 5 vezes e mantido em gelo por 20 minutos. O volume foi centrifugado a 20.000 xg e 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante contendo os plasmídeos foi novamente centrifugado a 20.000 xg e 4°C por 15 minutos. O novo sobrenadante (Fração Clarificada) foi reservado para a etapa de purificação dos plasmídeos, tendo sido reservada uma amostra de 120 uL (amostra C) para posterior análise em eletroforese.

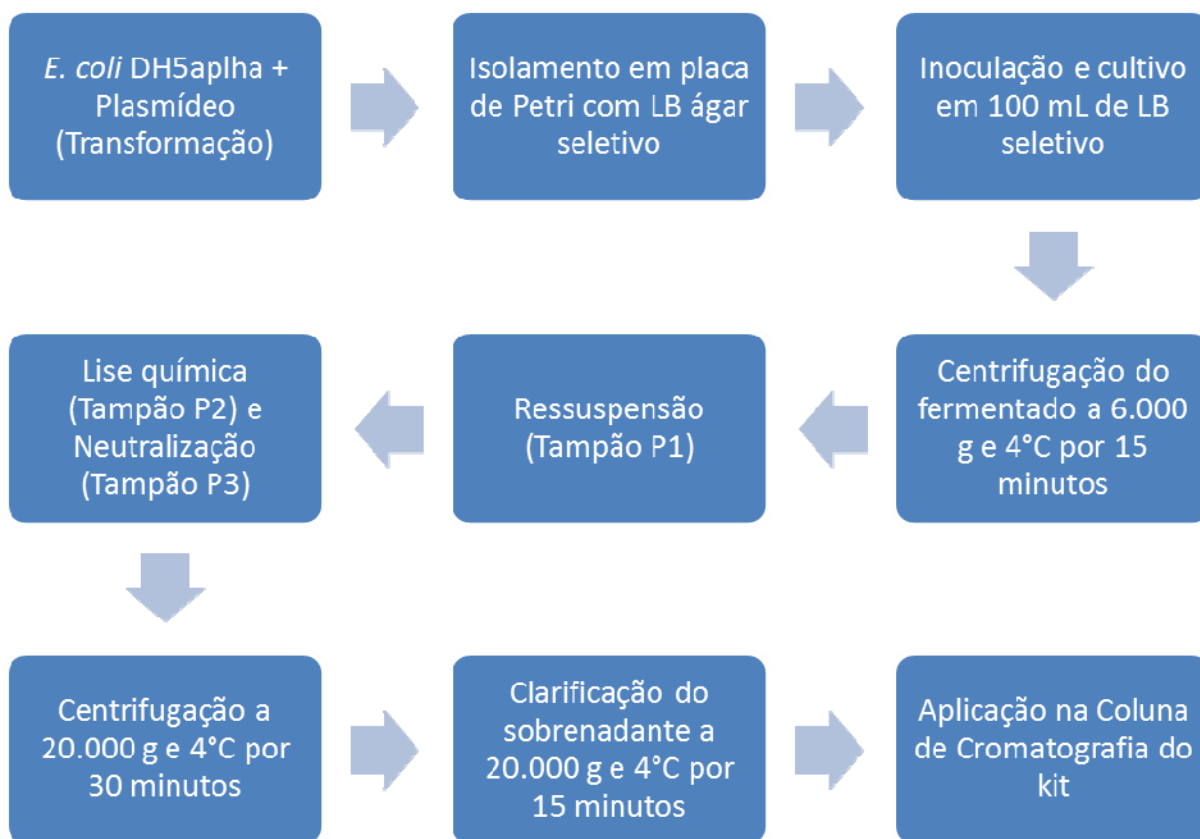


FIGURA 10 – ETAPAS DE CULTIVO CELULAR DO PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS
FONTE: O autor (2012)

A purificação dos plasmídeos foi realizada através de colunas de adsorção fornecidas com o kit comercial, seguindo protocolo sugerido pelo fabricante (QIAGEN, 2009) (FIGURA 11). Foi utilizada uma coluna por plasmídeo, uma única

vez, logo em seguida aos procedimentos anteriores. O procedimento foi realizado em Fluxo Laminar Classe II e a eluição foi feita por gravidade, ou seja, sem o uso de seringas ou bombas de vácuo.

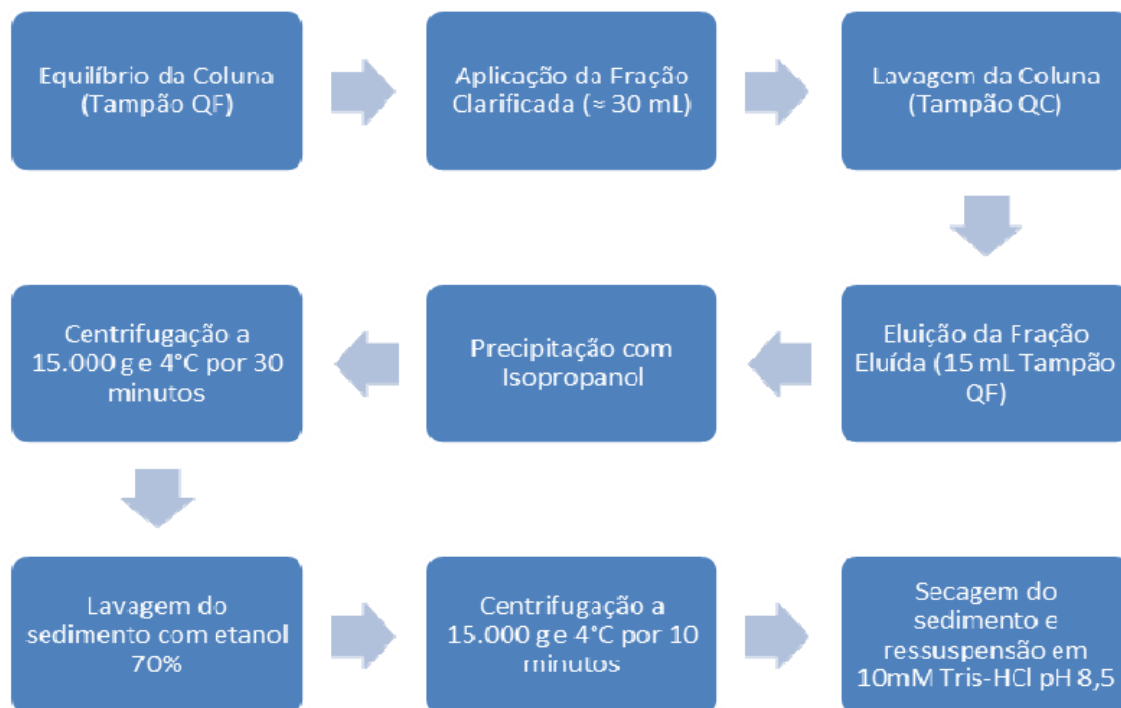


FIGURA 11 – ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS AMPLIFICADOS
FONTE: O autor (2012)

Primeiramente a coluna foi equilibrada com 10 mL do tampão QBT. Em seguida foi aplicado ao topo da coluna o sobrenadante obtido da segunda centrifugação (Fração Clarificada). Coletou-se a fração que não se ligou à coluna, chamada de Fração Não Ligada, e uma alíquota de 120 uL foi reservada (amostra NL). A coluna foi então lavada duas vezes com 30 mL de tampão QC (ao todo 60 mL), coletando-se a fração ao final da coluna (Fração de Lavagem) e reservando-se uma amostra de 240 uL das frações combinadas (amostra LV). A eluição foi realizada com 15 mL de tampão QF, coletando-se a Fração Eluída e reservando-se uma amostra de 60 uL (amostra E).

A precipitação dos plasmídeos foi realizada adicionando-se à Fração Eluída 10,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Agitou-se o tubo por inversão cinco vezes e este foi centrifugado a 15.000 xg e 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o sedimento lavado com 5 mL de etanol 70% a temperatura ambiente. O tubo foi então novamente centrifugado a 15.000 xg e 4°C

por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco em temperatura ambiente por 10 minutos, quando foi ressolubilizado em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,5 (Fração Final). Uma amostra foi retirada para análise em eletroforese e as Frações Finais foram armazenadas em - 80°C.

Para análise em gel de agarose, às amostras retiradas durante o processo de purificação (Frações Clarificada, Não Ligada, Lavagens 1 e 2 e Eluídas) adicionou-se 1 volume de álcool isopropílico a temperatura ambiente, centrifugado a 15.000 xg e 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em etanol 70% a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados 15.000 xg e 4°C por 10 minutos e, após descarte do sobrenadante e secagem do sedimento por 10 minutos a temperatura ambiente, estes foram ressuspensionados em 10 uL de tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,5. 2 uL destas amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, onde executou-se uma separação eletroforética a 80 V por uma hora. Após a corrida, o gel foi corado em solução contendo brometo de etídio e a visualização realizada em transiluminador equipado com lâmpada UV, onde foi fotodocumentado.

Com uma amostra da Fração Final de cada proteína foi realizada uma reação de restrição com a enzima *HindIII* por 3 horas a 37°C. Então, 5 uL foram aplicados em gel de agarose 1% e a eletroforese foi executada da mesma forma já mencionada.

3.7 PRODUÇÃO DOS PRÉ-INÓCULOS

A produção de pré-inóculos consiste na criação de um banco de células já transformadas capazes de produzir as proteínas recombinantes. Em processos convencionais, o choque térmico, processo no qual se insere o plasmídeo contendo o gene de interesse dentro da bactéria, é executado em todo início de fermentação, atrasando em 24 a 48 horas a produção em si.

Desta forma, buscou-se avaliar a possibilidade de executar o choque térmico uma única vez, cultivar o pré-inóculo e então aliquotar e armazenar estas bactérias sob congelamento, buscando-se uma forma de mantê-las estáveis ao longo do tempo. O plasmídeo codificante da proteína CFP-10 foi utilizado como modelo para este experimento.

Descongelou-se uma alíquota (100 μ L) de *E. coli* BL21 pLysS quimiocompetente, obtida conforme descrito no item 3.5, em gelo por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 10 μ L da solução de plasmídeo (item 3.6) à alíquota, e após homogeneização o microtubo foi mantido em gelo por 30 minutos. Incubou-se a mistura em banho-maria a 42°C por 90 segundos, retornando ao gelo por mais 2 minutos. O volume do microtubo foi então inoculado em tubo de centrifugação de 15 mL contendo 2 mL de meio LB sem antibiótico e incubado a 37°C por 1 hora a 200 rpm em agitador. Então, este volume foi inoculado em 18 mL de meio LB acrescido de cloranfenicol (concentração final de 25 mg/L) e ampicilina (concentração final de 100 mg/L) contidos em frasco Erlenmeyer de 125 mL, e incubado a 37°C e 200 rpm por 16 horas (FIGURA 12).

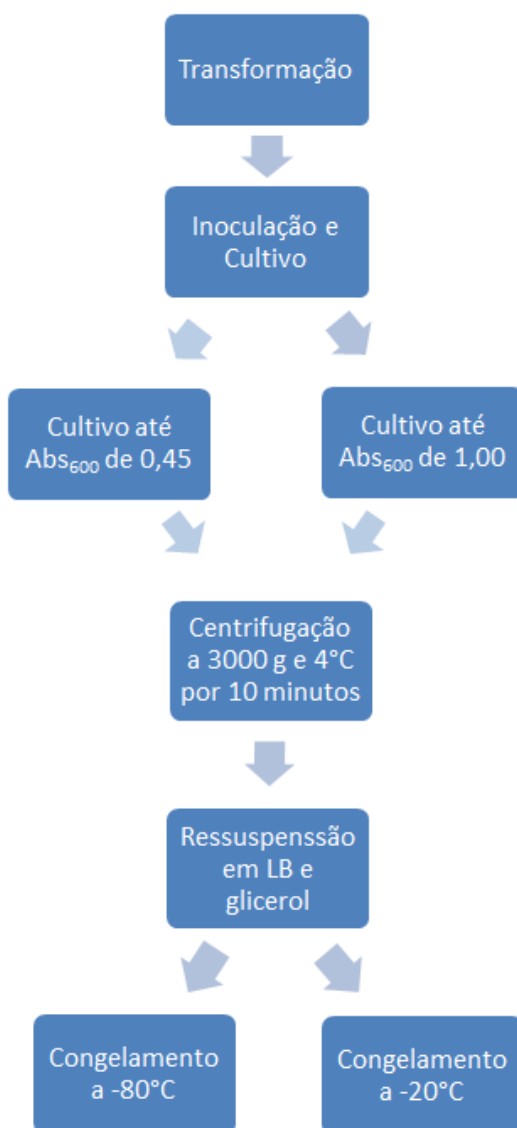


FIGURA 12 – ETAPAS DE PRODUÇÃO DOS PRÉS-INÓCULOS
FONTE: O autor (2012)

Após o período de incubação, duas alíquotas de 10 mL foram inoculadas em dois frascos Erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 40 mL de meio LB seletivo (cloranfenicol 25 mg/L e ampicilina 100 mg/L), totalizando 50 mL de fermentado em cada. Os frascos foram incubados a 37°C e 200 rpm, tendo suas absorbâncias a 600 nm (Abs_{600}) monitoradas. Meio LB seletivo esterilizado foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. A incubação foi interrompida quando a absorbância atingiu 0,45 para o primeiro frasco, e 1,00 para o segundo frasco.

Quando interrompida a incubação, o conteúdo do frasco foi centrifugado a 3000 xg e 4°C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de meio LB seletivo esterilizado. A esta solução adicionaram-se 5 mL de glicerol anidro esterilizado e a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos tipo vórtex e mantida em gelo. Alíquotas de 200 μ L foram distribuídas em microtubos pré-identificados, sendo 25 microtubos mantidos a - 20°C e 25 microtubos mantidos a - 80°C. Ao todo, quatro grupos de diferentes condições de congelamento foram avaliados (QUADRO 3).

Condição	Abs_{600}	Armazenamento
1	0,45	- 20°C
2	0,45	- 80°C
3	1,00	- 20°C
4	1,00	- 80°C

QUADRO 3 - CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE PRÉ-INÓCULOS TESTADAS
FONTE: O autor (2012)

Três microtubos de cada condição foram descongelados em gelo por 20 minutos e inoculados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio LB seletivo esterilizado. Estes foram então incubados a 37°C e 200 rpm por 6 horas e tiveram suas Abs_{600} monitoradas a cada 90 minutos. Este teste foi realizado 24 horas após o congelamento, e repetido após um ano.

Para as etapas seguintes, incluindo o teste de indução e as fermentações para produção das proteínas recombinantes, apenas os pré-inóculos pertencentes à Condição 4 do QUADRO 3 foram utilizados.

3.8 TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Com o objetivo de avaliar a influencia de concentrações diferentes do agente indutor da expressão das proteínas recombinantes (IPTG), três concentrações foram utilizadas: 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM. Como modelo foi utilizado o pré-inóculo da proteína MTSP-11.

Para tal, inoculou-se um microtubo de pré-inóculo, obtido conforme o item 3.7, em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 180 mL de meio LB seletivo, o qual foi incubado por 16 horas a 37°C e 200 rpm. Em seguida, três frascos Erlenmeyers de 500 mL com 180 mL de meio LB seletivo foram inoculados com 20 mL do frasco anterior, incubados a 37°C e 200 rpm e monitorados em espectrofotômetro até que tivessem absorvância de 0,8 no comprimento de onda de 600 nm (Abs_{600}).

Uma alíquota de 1 mL de um dos três frascos foi reservada, denominada Não-induzida (NI). Adicionou-se IPTG aos frascos até as concentrações finais de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM, e estes foram mantidos nas mesmas condições anteriores, retirando-se alíquotas de 1 mL a cada hora por um período de 4 horas, juntamente com a verificação de suas Abs_{600} .

As alíquotas, assim que retiradas, foram centrifugadas a 18.000 xg e 4°C por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado em 200 μ L de tampão de ressuspensão (20 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0), e sonicado em 4 ciclos de 15 segundos (4 pulsos contínuos de 15 segundos cada com intervalos de 15 segundos entre cada pulso) em potencia de 70%, em gelo. Os tubos foram então centrifugados a 15.000 xg por 10 minutos, reservando-se o sobrenadante (Fração Solúvel) e ressuspensionando-se o sedimento em 200 μ L de tampão de solubilização (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 6 M Uréia, 1 mM DTT, pH 8,0). Repetiram-se as etapas de sonicação e centrifugação descritas acima, sendo o sobrenadante denominado Fração Insolúvel. As Frações Insolúveis das três condições de indução (0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM) de todos os tempos (0, 1, 2, 3 e 4 horas) foram analisadas em SDS-PAGE.

3.9 FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A produção das proteínas recombinantes para teste em cobaios se deu por fermentação líquida em Erlenmeyers de dois litros contendo ao final um litro de fermentado. As três proteínas, ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11 foram produzidas e purificadas separadamente.

Uma alíquota de pré-inóculo, obtida conforme item 3.7, foi descongelada em gelo por 20 minutos e inoculada em frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de meio LB seletivo (cloranfenicol 25 mg/L e ampicilina 100 mg/L), o qual foi incubado em *shaker* a 37°C e 200 rpm por 16 horas.

Em seguida, inocularam-se 100 mL do inóculo em novo frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 900 mL de meio LB seletivo, o qual foi incubado em *shaker* a 37°C e 200 rpm e sua absorbância monitorada em espectrofotômetro a 600 nm (Abs_{600}). Meio LB seletivo esterilizado foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, e as amostras foram diluídas com o próprio meio LB esterilizado de forma que as Abs_{600} não ultrapassassem o valor de 1,00. Para manter a mesma diluição durante todas as medições, o monitoramento foi realizado diluindo-se as amostras retiradas dos frascos Erlenmeyers em igual volume de meio LB esterilizado.

No momento em que a absorbância atingiu 0,8, cerca de 60 a 90 minutos após a inoculação, adicionou-se o indutor de expressão (IPTG 0,1 mM). A partir deste momento a fermentação perdurou por mais 2 horas, com monitoramento da Abs_{600} de hora em hora.

3.10 PURIFICAÇÃO

Muitas vezes é possível induzir a expressão de proteínas em formas mais solúveis ou mais insolúveis através de modificações nos protocolos de fermentação. No entanto, neste trabalho aceitou-se a expressão das proteínas na sua forma insolúvel, e buscou-se utilizar um processo simplificado de purificação de acordo com esta escolha.

O processo de purificação se resume em 6 etapas: centrifugação para remoção do meio de cultivo e isolamento da biomassa bacteriana, rompimento celular por sonicação para liberação das proteínas recombinantes, solubilização e clarificação para preparar as amostras para a etapa cromatográfica, cromatografia

de afinidade para separar as proteínas recombinantes das demais e, por fim, padronização das amostras por ultrafiltração.

3.10.1 Centrifugação

Após o período de expressão, o meio fermentado foi centrifugado a 5.000 g e 4°C por 10 minutos. O sedimento celular foi ressuspensionado em 0,9% NaCl esterilizado e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sedimento foi guardado em gelo a 4°C até a primeira etapa de purificação por no máximo 16 horas.

3.10.2 Sonicação

As proteínas recombinantes são produzidas e armazenadas no interior da célula da *E. coli* no forma de agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. São cristais compostos majoritariamente pela proteína recombinante, apresentando alta pureza. Esta forma também confere estabilidade e proteção frente à ação de proteases, e as proteínas podem ser solubilizadas com agentes caotrópicos como uréia 6 – 8 M.

Como método de rompimento celular escolheu-se a sonicação, seguindo protocolo sugerido pela GE Healthcare para purificação de corpos de inclusão. (GE Healthcare Handbook 18-1142-75) Para isto, o sedimento foi ressuspensionado em 30 mL de tampão de ressuspensão (20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0). A homogeneização foi cuidadosamente realizada em agitador de tubos do tipo vórtex, de forma a evitar que o sedimento celular soltasse por inteiro do tubo de centrifugação. O volume foi então sonicado em 5 ciclos de 30 segundos (5 pulsos contínuos de 30 segundos cada com intervalos de 30 segundos entre cada pulso) em potência de 100%, em gelo. O sonicador utilizado foi o modelo Sonoplus HD 2070 da Bandelin.

Caso houvesse ainda algum aglomerado de biomassa não disperso, este era transferido para um novo tubo com auxílio de pipetador e sonicado novamente até completa dispersão. Caso a amostra permanecesse muito viscosa, repetia-se a sonicação até que fosse atingida a fluidez desejada.

Após sonicação inicial, a amostra foi centrifugada a 15.000 xg e 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante foi reservado (Fração Solúvel). O sedimento celular foi

então ressuspensionado em 30 mL de tampão de isolamento (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 2 M Uréia, 2% Tween-20, pH 8,0). Repetiu-se o mesmo processo de sonicação e centrifugação, sendo o sobrenadante denominado Fração de Isolamento.

O sedimento celular foi lavado duas vezes com tampão de ressuspensão para remoção da uréia através dos mesmos processos de ressuspensão e centrifugação já citados. O sedimento final foi armazenado a -80°C até a próxima etapa.

3.10.3 Solubilização e clarificação

Para a solubilização das proteínas recombinantes, ainda presentes na forma de corpos de inclusão insolúveis, o sedimento celular foi ressuspensionado em 30 mL de tampão de solubilização (20 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 6 M Uréia, 1 mM DTT, pH 8,0) e mantido sob agitação em temperatura ambiente por 2 horas. Caso houvesse aglomerados de biomassa, o volume era sonicado nas mesmas condições utilizadas até completa dispersão antes do período de solubilização.

Em seguida o volume foi centrifugado a $15.000 \times g$ e 10°C por 15 minutos para clarificação da amostra, sendo o sobrenadante resultante (Fração Clarificada) reservado e mantido a -80°C até a etapa de cromatografia.

3.10.4 Cromatografia de Afinidade

Para a cromatografia das três proteínas foram empregadas metodologias semelhantes, diferenciando-se na composição dos tampões utilizados, mais especificamente na concentração de imidazol. Também se alteraram alguns parâmetros durante a cromatografia automatizada de acordo com as características de cada amostra. A cromatografia automatizada foi realizada no sistema ÄKTApurifier GE Healthcare presente na Divisão de Vacinas Virais do Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR.

As colunas cromatográficas utilizadas foram as colunas pré-empacotadas HisTrap FF de 5 mL da GE Healthcare. Estas colunas são preenchidas com resina de níquel (Níquel Sepharose FF), a qual apresenta afinidade pelas caudas de polihistidina presentes na proteína recombinante, funcionando através do princípio de adsorção. A eluição foi realizada através do imidazol, composto que apresenta maior

afinidade pelo níquel, sendo então capaz de desligar a histidina da resina. Foi utilizada uma coluna para cada proteína, evitando contaminações cruzadas nas amostras purificadas.

Os protocolos utilizados foram variações daquele recomendado pelo próprio fabricante das colunas de cromatografia de forma a se adequar às características de cada proteína. As condições utilizadas em cada caso encontram-se nos QUADROS 4 a 6.

Amostra	30 mL da Fração Clarificada contendo a proteína ESAT-6, acrescido de 5 mM imidazol.
Vazão	5 mL/min
Tampão de Equilíbrio	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 6 M Uréia 5 mM imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Tampão de Renaturação	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 5 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Tampão de Eluição	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Etapas	1. Equilíbrio com 25 mL do tampão de equilíbrio; 2. Aplicação da amostra; 3. Aplicação do tampão de equilíbrio até que a absorbância em 280 nm voltasse para aproximadamente zero; 4. Lavagem com gradiente entre tampão de equilíbrio e tampão de renaturação com duração de 20 minutos (100 mL); 5. Eluição com gradiente entre tampão de renaturação e tampão de eluição com duração de 30 minutos (150 mL);
Coletor de Frações	10 mL por fração (2 minutos)

QUADRO 4 - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ESAT-6
FONTE: O autor (2012)

Após cada etapa cromatográfica, 150 uL de cada fração foram aliqotados e armazenados a - 80°C para posterior dosagem proteica e análise do perfil eletroforético.

Amostra	30 mL da Fração Clarificada contendo a proteína CFP-10.
Vazão	5 mL/min
Tampão de Equilíbrio	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 6 M Uréia 1 mM DTT pH 8,0
Tampão de Renaturação	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 5 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Tampão de Eluição	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Etapas	1. Equilíbrio com 25 mL do tampão de equilíbrio; 2. Aplicação da amostra; 3. Aplicação do tampão de equilíbrio até que a absorbância em 280 nm voltasse para aproximadamente zero; 4. Lavagem com gradiente entre tampão de equilíbrio e tampão de renaturação com duração de 25 minutos (125 mL); 5. Eluição com gradiente entre tampão de renaturação e tampão de eluição com duração de 25 minutos (125 mL);
Coletor de Frações	10 mL por fração (2 minutos)

QUADRO 5 - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CFP-10
FONTE: O autor (2012)

Amostra	30 mL da Fração Clarificada contendo a proteína MTSP-11, acrescido de 5 mM imidazol.
Vazão	5 mL/min
Tampão de Equilíbrio	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 6 M Uréia 5 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Tampão de Renaturação	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 5 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0
Tampão de Eluição	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 500 mM Imidazol 1 mM DTT pH 8,0

QUADRO 6 (CONTINUA) - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA MTSP-11
FONTE: O autor (2012)

Etapas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Equilíbrio com 25 mL do tampão de equilíbrio; 2. Aplicação da amostra; 3. Aplicação do tampão de equilíbrio até que a absorbância em 280 nm voltasse para aproximadamente zero; 4. Lavagem com gradiente entre tampão de equilíbrio e tampão de renaturação com duração de 20 minutos (100 mL); 5. Eluição com gradiente entre tampão de renaturação e tampão de eluição com duração de 25 minutos (125 mL);
Coletor de Frações	10 mL por fração (2 minutos)

QUADRO 6 (CONCLUSÃO) - PARÂMETROS DE CROMATOGRAFIA E CONSTITUIÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA MTSP-11
 FONTE: O autor (2012)

3.10.5 Dosagem de Proteína

A dosagem proteica das frações se deu pelo método de Bradford usando reagente comercial Bradford Reagent Sigma B6916, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.10.6 Análise em SDS-PAGE

Para análise do perfil eletroforético das amostras, 20 uL de cada fração de interesse foi diluído em 20 uL de tampão de amostra redutor em fervura por 5 minutos. Após este período, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 15% e realizada a corrida a 80 V até que a linha de frente atingisse a extremidade da placa de vidro (aproximadamente 4 horas). Após o término da corrida, o gel foi corado em solução de coloração Comassie Blue por uma hora com agitação e descorado em solução de descoloração também sob agitação. A composição de todos os tampões utilizados bem como a composição do gel de poliacrilamida encontram-se nos ANEXOS 3 e 4.

3.10.7 Ultrafiltração

O tampão em que se encontram as proteínas eluídas da cromatografia de afinidade precisa ser substituído por um mais adequado ao teste *in vivo* e também precisa permitir uma melhor estabilização da proteína. Além disso, as concentrações

proteicas precisam ser ajustadas para a concentração desejada (1 mg/mL) através de concentração ou diluição.

A ultrafiltração é uma técnica que permite realizar todas estas ações em um processo simples e único. Para isso, utilizou-se o sistema da Millipore Amicon Ultra 15 com membrana de 3,5 kDa, seguindo protocolo do fabricante.

Com base na concentração apontada pela dosagem das frações eluídas da cromatografia, o volume equivalente a 7 mg de proteína foi adicionado ao reservatório do filtro, e o volume foi completado até 10 mL com o tampão PBS, especificado no QUADRO 7. Após centrifugação a 5.000 xg e 4°C por 60 minutos, o reservatório foi preenchido novamente até 10 mL com o tampão PBS (adição de aproximadamente 9,5 mL de PBS). Após nova centrifugação, o processo foi repetido mais uma vez, e ao final o volume foi ajustado para 5 mL. A confirmação da concentração proteica foi realizada pelo método de Bradford, sendo adicionado tampão PBS na quantidade necessária para acertar a concentração de proteína em 1 mg/mL. Foi então realizada a análise da amostra em SDS-PAGE conforme descrito no item 3.10.6.

As amostras já padronizadas foram armazenadas a - 20°C.

Água ultrapura q.s.p	1000 mL
Fosfato Monopotássico (KH ₂ PO ₄)	0,24 g
Fosfato Dissódico (Na ₂ HPO ₄)	1,44 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,2 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	8,0 g
pH 7,4, esterilizado a 121°C por 15 minutos.	

QUADRO 7 - COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO PBS UTILIZADO NA PADRONIZAÇÃO DAS AMOSTRAS
FONTE: O autor (2012)

4 RESULTADOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Os plasmídeos codificantes para as proteínas ESAT-6 e CFP-10 na forma circular apresentaram massa molecular entre 3000 e 4000 pares de bases (pb) (FIGURA 13). O plasmídeo codificante para a proteína MTSP-11 na forma circular apresentou massa molecular entre 3054 e 4072 pb (FIGURA 14). Uma segunda banda com massa molecular entre 1636 e 2036 pb também foi observada nas amostras de purificação do plasmídeo da proteína MTSP-11. Nas amostras Não Ligada e Lavagem, na purificação dos três plasmídeos, não se observou a presença de bandas.

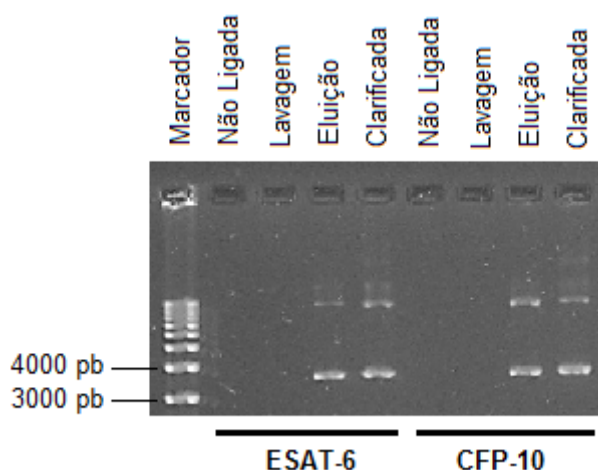


FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS ESAT-6 E CFP-10

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Marcador 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen

Após corte com a enzima de restrição *Hind*III das amostras de Eluição, os plasmídeos lineares das proteínas ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11 apresentaram massa molecular entre 5000 e 6000 pb (FIGURA 15). Uma banda de baixa intensidade com massa molecular de aproximadamente 2000 pb foi observada na amostra MTSP-11.

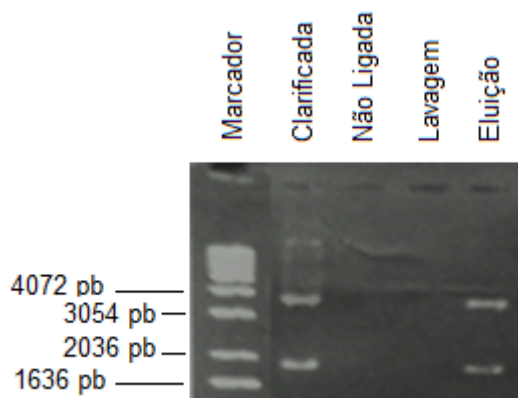


FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO MTSP-11

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Marcador 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen

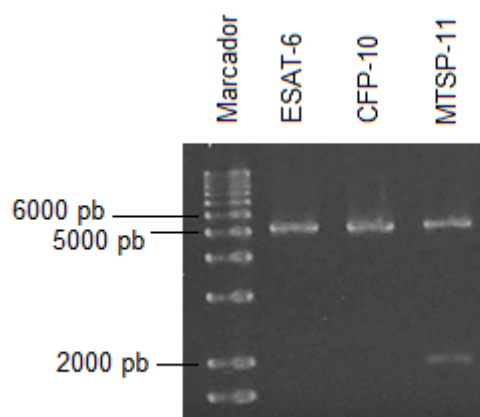


FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS APÓS CORTE COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *HindIII*

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Marcador 1kb Plus DNA Ladder Invitrogen

4.2 PRODUÇÃO DOS PRÉ-INÓCULOS

Nas condições avaliadas após 24 horas de congelamento, as absorbâncias em 600 nm variaram de 0,022 a 1,103 no período de 6 horas após inoculação (FIGURA 16). A condição avaliada de pré-inóculo com 1,00 de absorbância e mantida a - 80°C apresentou as maiores absorbâncias iniciais (0,025) e finais (1,103). Os menores valores foram obtidos na condição com 0,45 de absorbância e mantida a - 20°C, onde a absorbância inicial foi de 0,022 e a final de 1,025.

Após um ano de congelamento, as cinéticas de crescimento celular observadas nas quatro condições foram diferentes (FIGURA 17). O pré-inóculo com

absorbância de 0,45 e congelado a -20°C apresentou absorbância final de 0,503, enquanto o pré inóculo com mesma absorbância (0,45) e mantido a -80°C atingiu a densidade ótica de 1,120 ao final do período de seis horas. Entre as condições de pré-inóculos com absorbância de 1,00, aquela mantida a -80°C atingiu densidade ótica de 1,123, enquanto aquela mantida a -20°C atingiu o valor de 0,877. Todas as condições iniciaram o crescimento com absorbâncias de $0,002 (\pm 0,001)$.

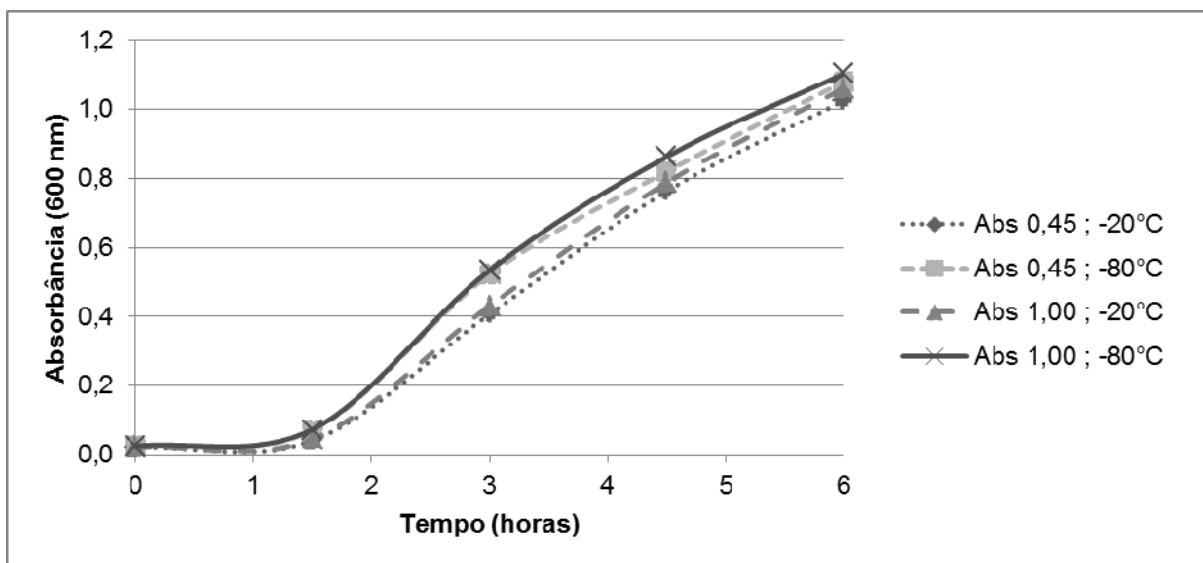


FIGURA 16 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DOS PRÉ-INÓCULOS NAS CONDIÇÕES AVALIADAS APÓS 24 HORAS DE CONGELAMENTO

FONTE: O autor (2012)

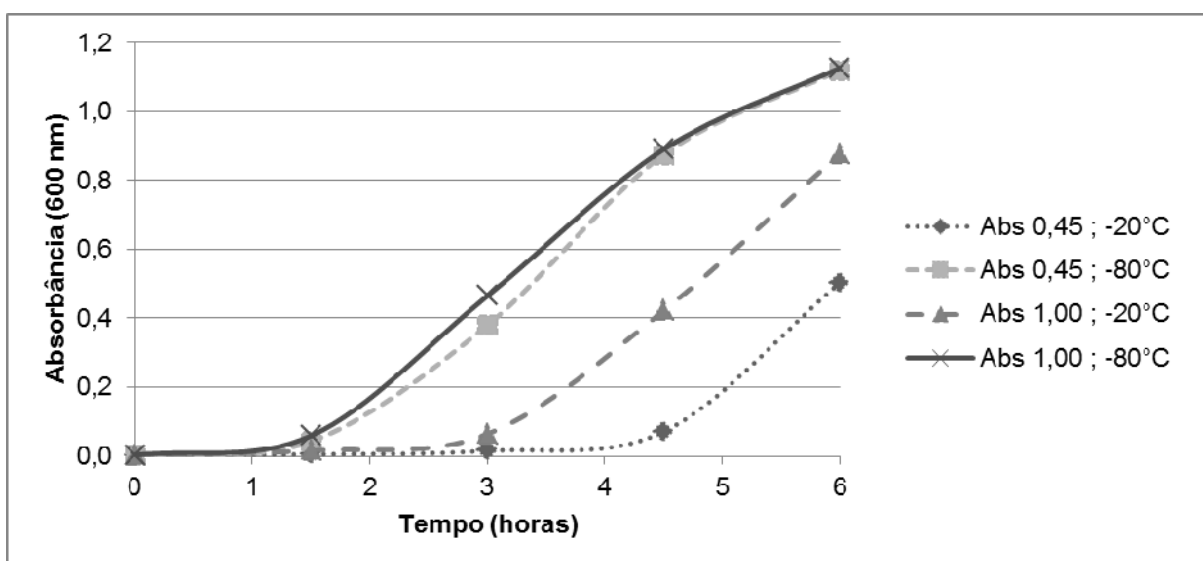


FIGURA 17 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DOS PRÉ-INÓCULOS NAS CONDIÇÕES AVALIADAS APÓS UM ANO DE CONGELAMENTO

FONTE: O autor (2012)

Quando comparadas as cinéticas de crescimento celular das condições congeladas a - 80°C após 24 horas e um ano de congelamento, a absorbância final média de todas as amostras foi de 1,103 (FIGURA 18). A maior diferença nos valores de leitura foram observados na hora 3, com intervalo entre 0,380 (Abs 0,45 ; 1 ano) e 0,534 (Abs 1,00 ; 24 horas). Esta diferença foi menor ao final do período, com intervalo de 1,079 e 1,127, respectivamente.

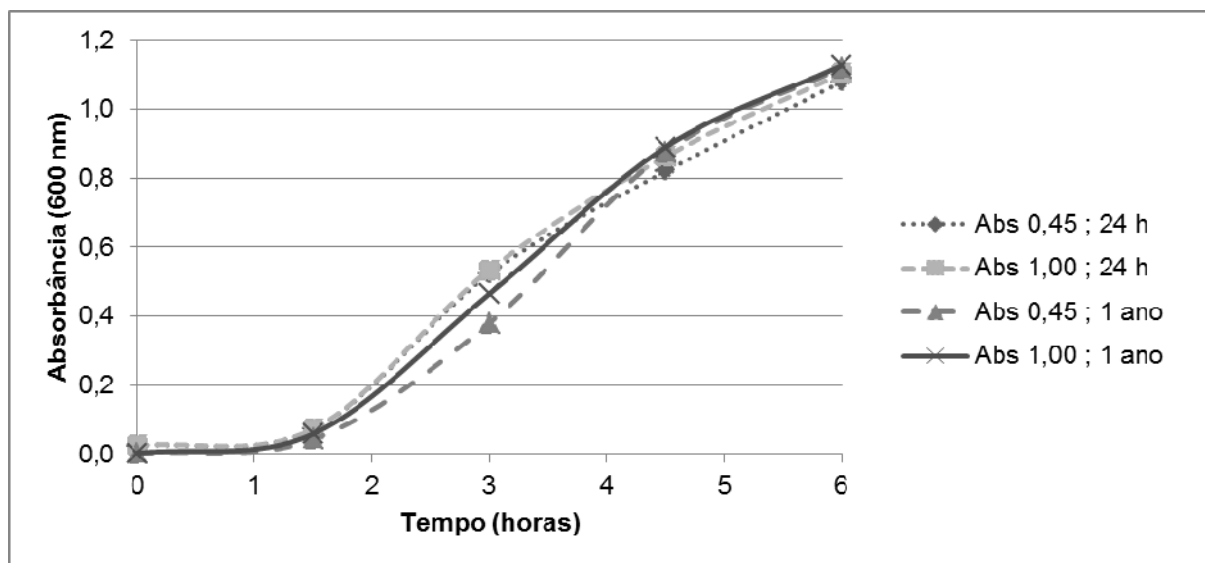


FIGURA 18 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DOS PRÉ-INÓCULOS MANTIDOS A - 80°C APÓS UM DIA E UM ANO DE CONGELAMENTO

FONTE: O autor (2012)

As velocidades de crescimentos (dx/dt) calculadas para as quatro condições após 24 horas de congelamento foram semelhantes, com valor médio de 0,238 g/L.h (QUADRO 8). Após um ano de congelamento, os pré-inóculos mantidos a - 80°C apresentaram velocidades de crescimento superiores àqueles mantidos a - 20°C.

Condições Avaliadas		Tempo de Armazenamento	
Temperatura	Absorbância	24h	1 ano
- 20°C	0,45	0,230 g/L.h	0,183 g/L.h
	1,00	0,237 g/L.h	0,290 g/L.h
- 80°C	0,45	0,240 g/L.h	0,413 g/L.h
	1,00	0,244 g/L.h	0,390 g/L.h

QUADRO 8 – VELOCIDADES DE CRESCIMENTO (dx/dt) DOS PRÉS-INÓCULOS NAS CONDIÇÕES AVALIADAS

FONTE: O autor (2012)

4.3 TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Na análise cinética do crescimento celular das células de *E. coli* após adição do agente indutor não se observou a existência das fases Lag e estacionária de crescimento (FIGURA 19). As absorbâncias finais variaram de 2,024 a 2,264 em espectrofotometria com leitura a 600 nm, sendo o maior valor encontrado na condição induzida com 0,1 mM de IPTG.

Os resultados obtidos nas condições de indução de 0,5 e 1 mM de IPTG mantiveram-se próximos durante as quatro horas analisadas, sendo a maior diferença encontrada ao final da fermentação (0,07 unidades).

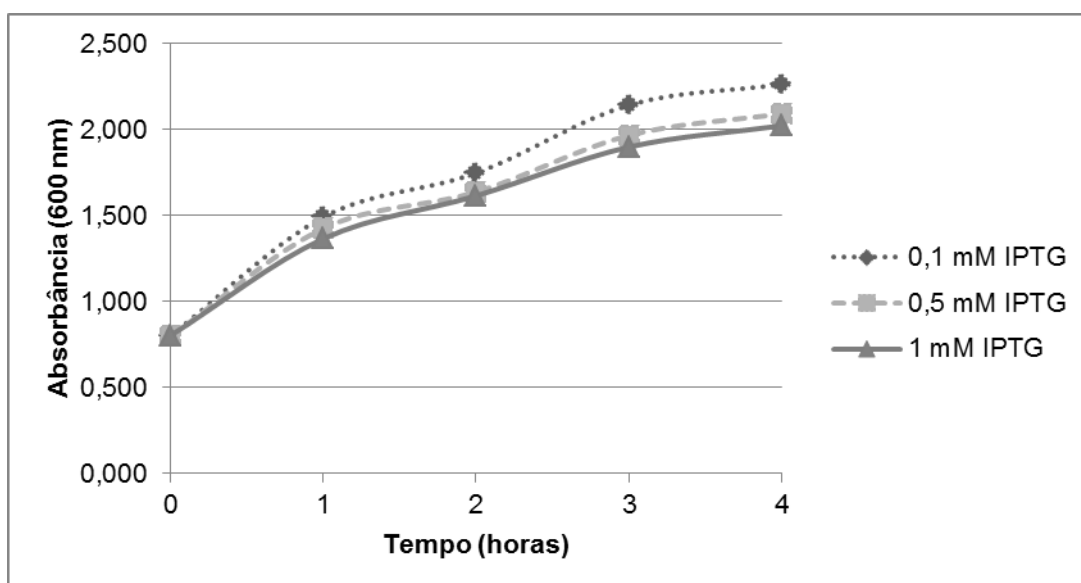


FIGURA 19 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE *E. coli* APÓS ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG) NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1, 0,5 E 1 mM
FONTE: O autor (2012)

A relação entre o logaritmo natural da concentração celular e o tempo confirmou a inexistência das fases Lag e estacionária no período de tempo avaliado (FIGURA 20). Após a adição do agente indutor (hora zero), as células bacterianas mantiveram altas taxas específica de crescimento (μ) até o final da primeira hora (QUADRO 9). A partir deste momento, observou-se a redução da inclinação da reta que descreve as medições de absorbância, demonstrando a redução das velocidades específicas de crescimento.

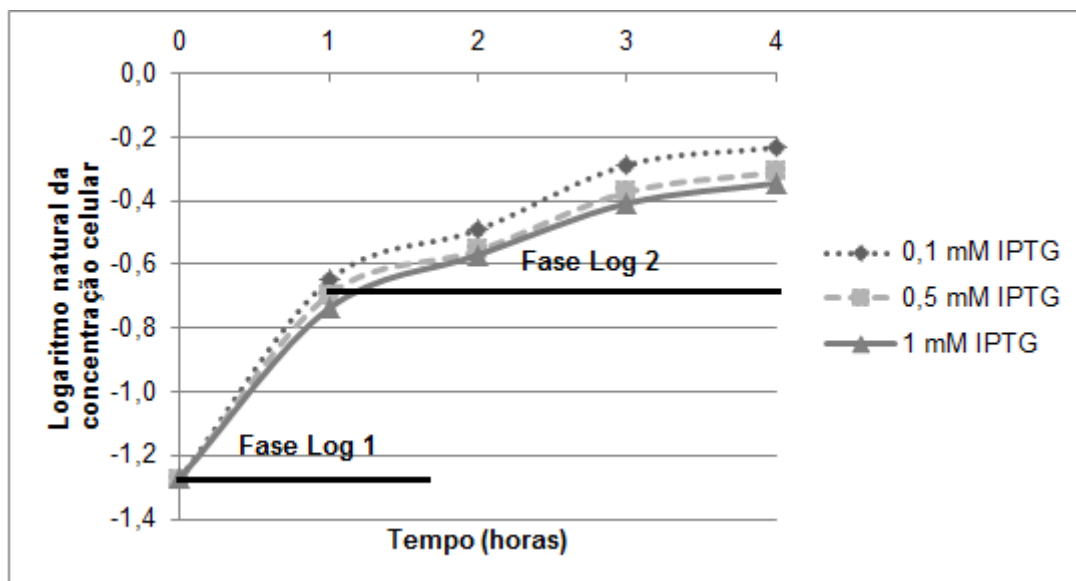


FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DAS FASES DE CRESCIMENTO CELULAR EM CULTIVO DE *E. coli* APÓS ADIÇÃO DO AGENTE INDUTOR (IPTG) NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1, 0,5 E 1 mM
 FONTE: O autor (2012)

IPTG	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	
	Fase Log 1	Fase Log 2
0,1 mM	0,622	0,139
0,5 mM	0,581	0,128
1 mM	0,533	0,131

QUADRO 9 – VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO CELULAR NA PRESENÇA DE AGENTE INDUTOR EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
 FONTE: O autor (2012)

A análise de expressão da proteína MTSP-11 nas frações insolúveis (FIGURA 21), em gel de poliacrilamida 15% corado com Azul de Comassie, revelou que as três condições de indução utilizadas levaram a padrões de expressão semelhantes.

Na primeira hora após indução observaram-se bandas de mesma intensidade para as três concentrações de agente indutor. Comportamento semelhante foi encontrado nas amostras das segunda, terceira e quarta horas. As intensidades das bandas não aumentaram após a segunda hora de cultivo na fase de indução.

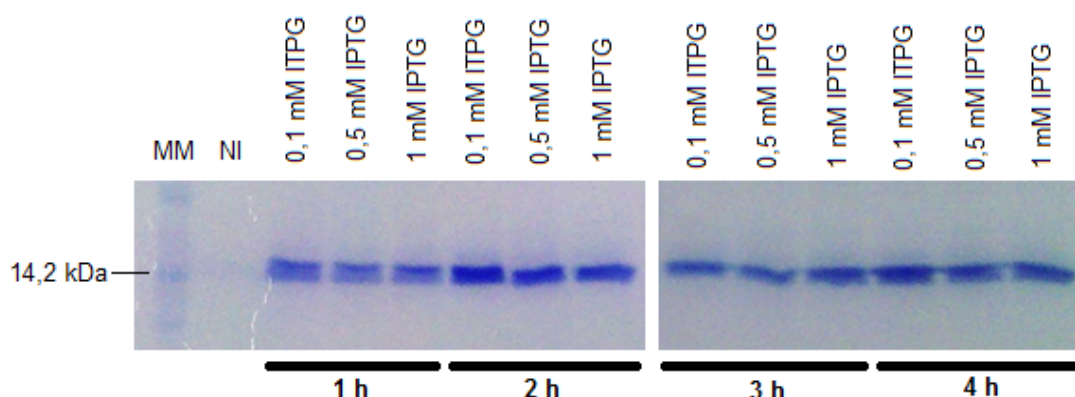


FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS DA PROTEÍNA MSTP-11 APÓS ADIÇÃO DE IPTG NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1, 0,5 E 1 mM, EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: MM = Marcador de Massa Molecular Sigma Dalton Mark VII-L; NI = Amostra Não Induzida (antes da adição de IPTG).

4.4 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O crescimento celular bacteriano foi linear na produção das três proteínas (FIGURA 22). O valor da absorbância logo após inoculação foi de 0,472 a 0,538, atingindo ao final da fermentação os valores de 1,368, 1,570 e 1,716 para a produção das proteínas ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11, respectivamente. Em todos os casos, a indução foi realizada após uma hora de fermentação, seguido de mais duas horas para expressão das proteínas.

As concentrações finais de biomassa, em base seca, foram de 0,479 g/L (ESAT-6), 0,550 g/L (CFP-10) e 0,601 g/L (MTSP-11). A avaliação dos logaritmos naturais das concentrações celulares confirmou a ausência das fases Lag e estacionária durante os cultivos (FIGURA 23). A determinação das velocidades específicas de crescimento celular (μ), calculadas para cada hora de fermentação, apontou a redução gradual da taxa de crescimento no decorrer da fermentação (QUADRO 10). Em nenhum momento a taxa específica de crescimento foi próxima ou igual à zero, características das fases Lag e estacionária.

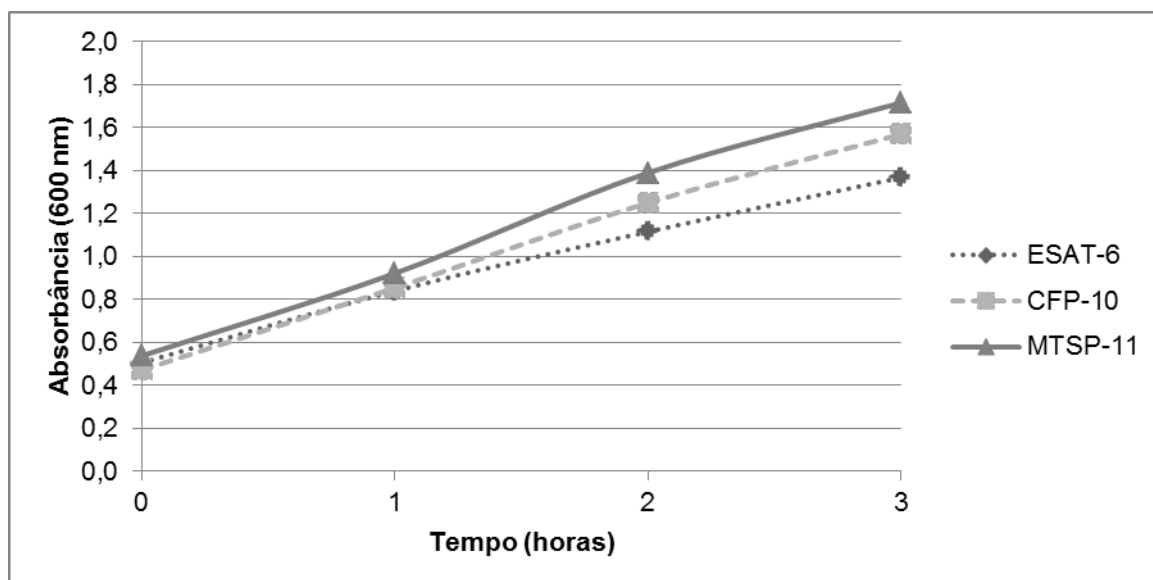


FIGURA 22 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE *E. coli* PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Indução realizada após a primeira hora de fermentação.

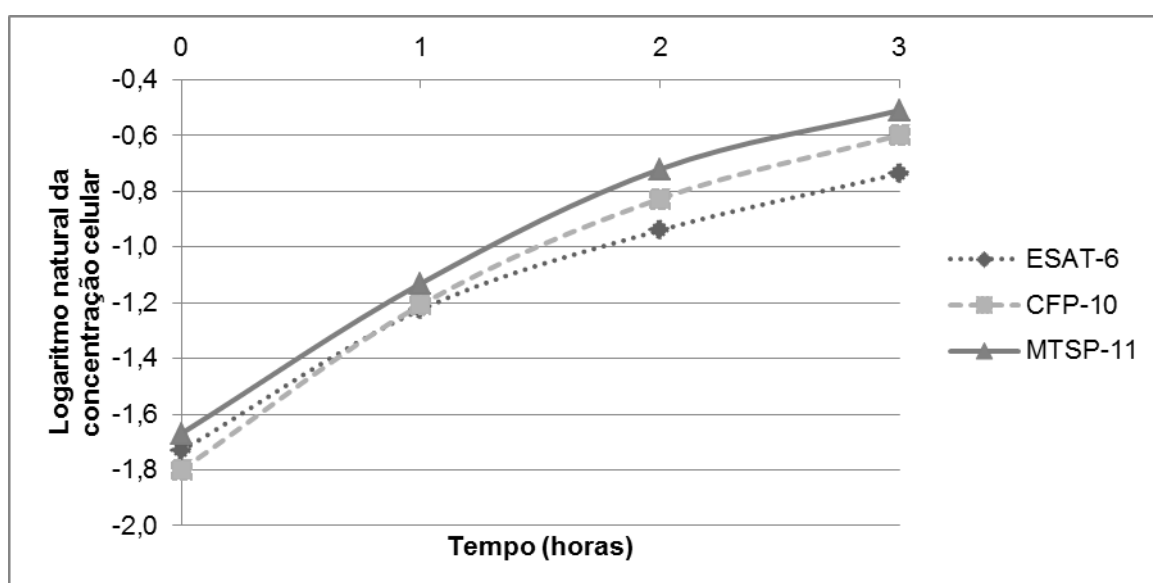


FIGURA 23 – AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR DE *E. coli* PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Indução realizada após a primeira hora de fermentação.

Proteína	Velocidade Específica de Crescimento μ (h^{-1})		
	1ª hora	2ª hora	3ª hora
ESAT-6	0,507	0,284	0,204
CFP-10	0,593	0,381	0,228
MTSP-11	0,539	0,411	0,211

QUADRO 10 – VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO PARA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11 A CADA INTERVALO DE HORA

FONTE: O autor (2012)

4.5 PURIFICAÇÃO

4.5.1 Sonicação

Nas frações oriundas da etapa de sonicação da biomassa bacteriana, quando analisadas por SDS-PAGE, observou-se que a maior concentração das proteínas totais estava presente na Fração Solúvel (FIGURA 24). Baixas concentrações das proteínas recombinantes CFP-10 e MTSP-11 foram identificadas na Fração de Isolamento, com massas moleculares próximas a 14,2 kDa, junto a outras proteínas de maior massa molecular. Na Fração de Clarificada observam-se bandas de forte intensidade, especialmente no caso da proteína MTSP-11. Estas bandas correspondem às proteínas recombinantes, e diferiram-se das demais pelo nível de expressão. Outras proteínas de massa molecular maior também foram encontradas nesta fração, evidenciando a necessidade de etapas adicionais de purificação.

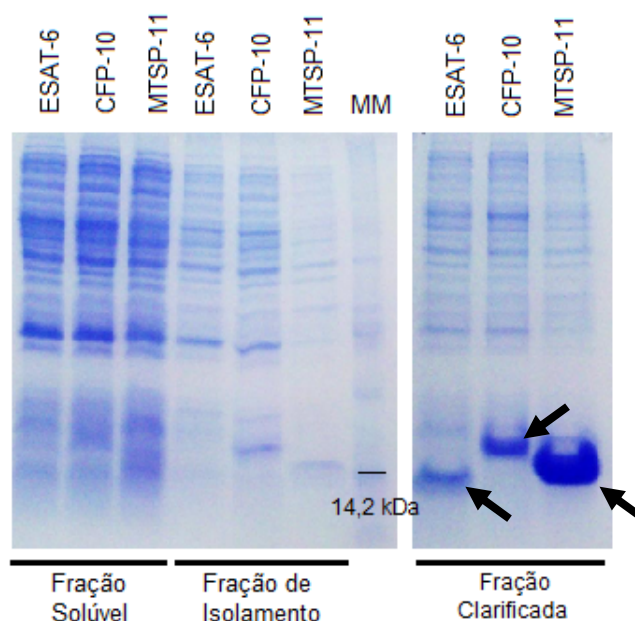


FIGURA 24 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DE SONICAÇÃO DA BIOMASSA BACTERIANA PARA PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: MM = Marcador de Massa Molecular Sigma Dalton Mark VII-L.

Ao nível macroscópico, as Frações Clarificadas apresentaram-se pouco viscosas e levemente amareladas e foram mantidas a - 80°C até a etapa de cromatografia.

4.5.2 Cromatografia de Afinidade

A purificação da Fração Clarificada da proteína MTSP-11 em sistema automatizado permitiu obtenção do cromatograma apresentado na FIGURA 25. Observou-se um grande pico de absorbância (280 nm) após aplicação da amostra, representando a Amostra Não Ligada. Esta fração corresponde às proteínas presentes na Fração Clarificada que não são capazes de se ligar à resina cromatográfica. No início da etapa de lavagem foi observado um pequeno pico correspondendo às proteínas que se ligaram fracamente à resina.

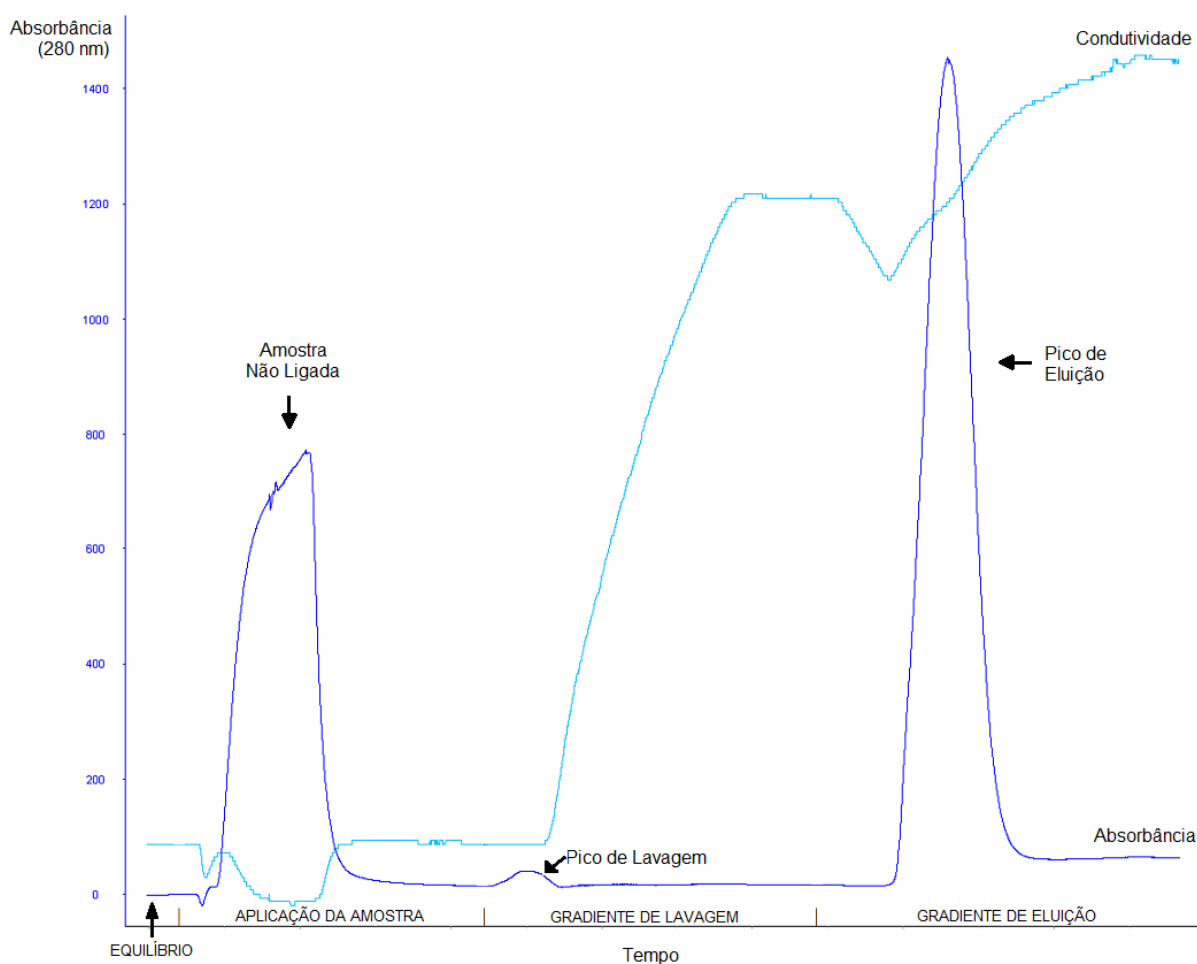


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DE PURIFICAÇÃO EM COLUNA DE AFINIDADE COM NÍQUEL DA FRAÇÃO CLARIFICADA DE MTSP-11

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Cromatograma fornecido pelo software Unicorn (GE Healthcare). Cromatografia de Afinidade realizada em coluna HisTrap FF (GE Healthcare) com vazão de 5 mL/minuto.

O próximo pico de absorbância foi observado durante a fase de eluição das proteínas ligadas à coluna, no momento em que o tampão de eluição correspondia a

30% do fluxo bombeado através da coluna cromatográfica. Ao final do pico de eluição a porcentagem do tampão de eluição era de 45%. Cromatogramas semelhantes foram obtidos na purificação das proteínas ESAT-6 e CFP-10 (dados não apresentados).

O resultado do SDS-PAGE com as frações da etapa cromatográfica da proteína ESAT-6 demonstrou que não houve perda significativa da proteína recombinante durante a etapa de purificação (FIGURA 26). Não foi observada a presença da banda correspondendo à proteína recombinante durante a fase de lavagem, e uma fraca banda foi observada na amostra Não Ligada. A proteína foi eluída como única banda em quatro frações. A quantificação proteica destas frações apontou um rendimento de 23,88 mg de proteína recombinante por litro de meio fermentado (mg/L).

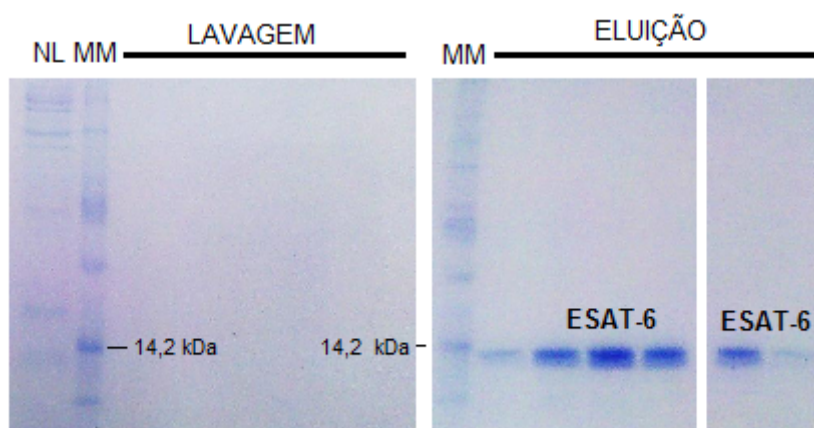


FIGURA 26 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA ESAT-6 EM GEL DE POLIACRILÂMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: NL = Amostra Não Ligada; MM = Marcador de Massa Molecular Sigma Dalton Mark VII-L

Na purificação da proteína CFP-10, o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida revelou uma banda de massa molecular próxima de 14,2 kDa na amostra Não Ligada, correspondendo à proteína recombinante (FIGURA 27). Bandas semelhantes não foram identificadas durante a etapa de lavagem, que apresentou apenas uma banda com massa molecular próxima a 60 kDa. A proteína recombinante foi eluída em apenas duas frações, nas quais não foi identificada nenhuma outra banda. A dosagem por Bradford apontou um rendimento de 22,7 mg/L.

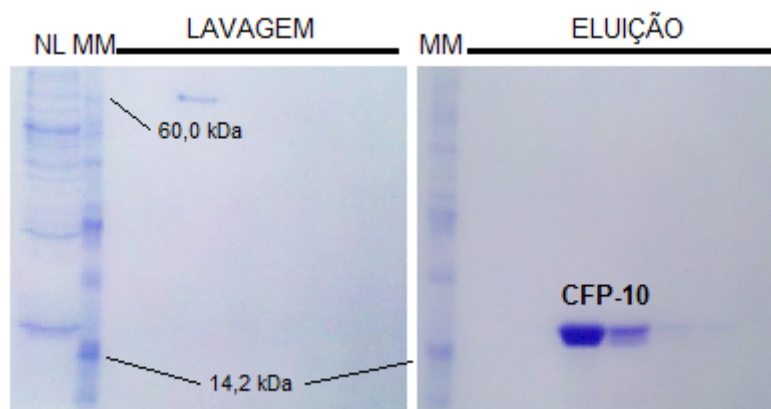


FIGURA 27 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA CFP-10 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: NL = Amostra Não Ligada; MM = Marcador de Massa Molecular Sigma Dalton Mark VII-L

A análise do SDS-PAGE das frações de purificação da proteína MTSP-11 identificaram uma fraca banda correspondendo à proteína recombinante na amostra Não Ligada, junto a outras bandas mais intensas com massa molecular superior (FIGURA 28). Durante a lavagem nenhuma banda pode ser identificada. As frações de eluição apresentaram alta concentração da proteína recombinante, e por isso foram diluídas em água ultrapura para execução da eletroforese e visualização. Elas foram identificadas como bandas únicas em cinco frações de eluição, onde as três mais intensas corresponderam a um rendimento de 143,5 mg/L de meio fermentado segundo quantificação pelo método de Bradford.

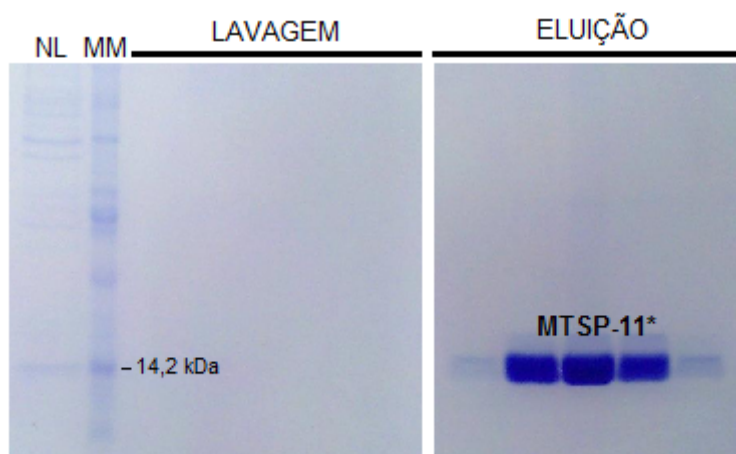


FIGURA 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DA PROTEÍNA CFP-10 EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: NL = Amostra Não Ligada; MM = Marcador de Massa Molecular Sigma Dalton Mark VII-L; (*) Frações diluídas 1:1 em água ultrapura.

4.5.3 Ultrafiltração

Após descongelamento das frações eluídas da etapa cromatográfica observou-se a formação de precipitados, principalmente no caso da proteína ESAT-6. Estes precipitados não foram ressolubilizados totalmente com agitação, aquecimento gradativo até a temperatura de 37°C em banho-maria ou adicionando-se Glicerol anidro até a concentração de 20%.

Após ultrafiltração, as amostras apresentaram-se opacas e com cristais em suspensão. Devido ao caráter insolúvel da amostra e a presença de precipitados, a etapa de ultrafiltração apresentou perda de 20 a 30% do total de proteínas nas amostras com base nas dosagens por Bradford ao final da etapa cromatográfica e ao final do processo de ultrafiltração.

A análise em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% das proteínas CFP-10 e MTSP-11 após ultrafiltração não apontou qualquer contaminação das proteínas quando revelada com Azul de Comassie (FIGURA 29). Na amostra referente à proteína ESAT-6, duas outras bandas, além daquela referente à proteína recombinante, foram reveladas com baixa intensidade. Embora as amostras estivessem com a concentração de 1 mg/mL segundo dosagem por Bradford, as intensidades de suas bandas no SDS-PAGE mostraram-se distintas.

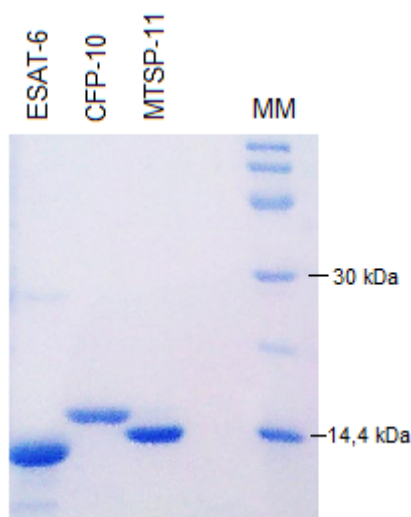


FIGURA 29 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMOSTRAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11 NA CONCENTRAÇÃO DE 1 mg/mL APÓS ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 3,5 kDa, EM GEL DE POLIACRILAMIDA 15% CORADO COM AZUL DE COMASSIE

FONTE: O autor (2012)

NOTA: MM = Marcador de Massa molecular Amersham LMW gel filtration kit. .

5 DISCUSSÃO

5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Os plasmídeos codificantes para as proteínas ESAT-6 e CFP-10 foram eluídos com alta pureza. Ambos apresentaram banda única em gel de agarose após corte com a enzima de restrição (FIGURA 15). O plasmídeo da proteína MTSP-11 apresentou uma segunda banda na análise eletroforética, com intensidade inferior àquela apresentada pela banda correspondente ao plasmídeo na forma linear. Essa banda mais fraca pode ser um artefato de amplificação ou ainda representar formas *supercoil* dos mesmos plasmídeos.

Não foi identificada a perda de plasmídeos durante o processo de purificação dos três plasmídeos recombinantes, visto que não foi detectada a presença de bandas nas amostras Não Ligada e de Lavagem (FIGURAS 13 e 14). Este fato demonstrou a alta eficiência do processo de amplificação dos plasmídeos.

5.2 PRODUÇÃO DE PRÉ-INÓCULOS

O estudo da cinética de crescimento celular após 24 horas de congelamento (FIGURA 16) revelou comportamentos muito semelhantes nas quatro condições testadas. Neste período de armazenamento não houve diferença quanto à eficiência de inoculação entre as condições. Após um ano de armazenamento, contudo, os resultados foram divergentes. Enquanto os pré-inóculos congelados a - 20°C apresentaram uma fase Lag mais longa (3 a 4 horas), aqueles mantidos a - 80°C demonstraram uma cinética de crescimento semelhante àquela exibida após 24 horas de congelamento (FIGURA 18).

A avaliação da velocidade de crescimento celular (QUADRO 8) corrobora estes resultados. A diferença entre os valores de dx/dt apresentados pelas amostras congeladas a - 20°C e a - 80°C após um ano foi de 25,6 a 55,7%, tendo os pré-inóculos mantidos a - 80°C apresentado velocidades superiores.

Estes resultados revelam a manutenção da viabilidade celular no período de um ano. Este fator permite que o resultado de uma única etapa de transformação

(choque térmico) possa ser utilizado para a fermentação de vários litros de meio de cultivo.

A possibilidade de utilização destes pré-inóculos leva à economia de plasmídeos. Cada processo de transformação consome em média 2 a 10 uL de plasmídeos, o que levaria a necessidade de amplificação destes com frequência semestral ou anual. Além da dificuldade técnica, o processo inteiro seria mais custoso. Os resultados mostraram grande estabilidade das células congeladas a - 80°C, permitindo que o processo de transformação seja feito no máximo anualmente, sem comprometer a cinética de fermentação.

A segunda consequência importante é a economia de tempo e melhora na produtividade. O tempo necessário entre a transformação das células bacterianas e a obtenção de um inóculo líquido é de 24 a 48 horas, dependendo se é realizado ou não o crescimento em placa de Petri para isolamento das colônias. Mesmo que as colônias já transformadas sejam mantidas em placa de Petri, ainda sim seriam necessárias 16 horas em média para obtenção de um inóculo líquido.

Considerando que o tempo em que o inóculo fica em incubação até a sua adição ao meio para a produção seja de 16 horas, as diferenças entre as condições testadas podem tornar-se menores, viabilizando o congelamento a - 20°C. Contudo, pode-se estimar que esta metodologia mostre-se inadequada em prazos mais longos do que os 365 dias avaliados.

Por fim, considerando-se a presença de ampicilina e de cloranfenicol nos meios de fermentação, é possível inferir que, mesmo após o período de um ano, as bactérias mantiveram o plasmídeo em seu interior de forma funcional, caso contrário elas não seriam capazes de crescer na presença destes dois componentes.

Apesar da vantagem oferecida pelo uso de pré-inóculo já transformados à produção de proteínas recombinantes, não foi encontrado na literatura algum trabalho que envolvesse etapa semelhante.

5.3 TESTE DE INDUÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG

O teste de indução possibilitou confirmar que, segundo o modelo adotado, a concentração de 0,1 mM de agente indutor (IPTG) é suficiente para maximizar a expressão, que atinge um máximo aparente após 2 horas de indução. Assim, tem-se um processo que necessita de menor quantidade de IPTG, cinco vezes menor do

que aquela preconizada como padrão. (GE Healthcare Handbook 18-1142-75). O preço para importação de 10 g de IPTG é de R\$ 1500,00 a R\$ 2000,00, desconsiderando encargos. O uso de 0,5 mM de IPTG, para a indústria, representa um custo de até R\$ 24000,00 a cada 1000 L de meio fermentado. Com o uso da concentração de 0,1 mM, este custo reduz para R\$ 4800,00 a cada 1000L de meio fermentado.

Tem-se também um processo rápido, com duração de 3 a 4 horas entre inoculação e término da expressão. Este perfil é muito importante para a transferência da tecnologia à indústria, onde o tempo de processamento e, consequentemente, o gasto com insumos e utilidades têm forte impacto sobre a produtividade e viabilidade do processo.

5.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

5.4.1 Crescimento celular de *E. coli* para expressão

A inexistência de uma fase Lag no crescimento celular de *E. coli* recombinante é semelhante àquela observada por Chaves (2009). O autor atribuiu este comportamento a dois fatores: (a) curto tempo de replicação da célula bacteriana (20 minutos), de forma a ocultar o efeito em amostragens a cada 60 minutos; (b) possibilidade da célula já estar devidamente adaptada às condições de cultivo. O intervalo de amostragem utilizado no presente trabalho (30 minutos) também não identificou a existência da fase Lag, corroborando a segunda hipótese.

A continuidade de crescimento celular mesmo após adição do IPTG sugere que o sistema de expressão utilizado (vetor pDest17 e promotor T7) ainda não é suficiente para direcionar por completo o metabolismo energético para a expressão da proteína recombinante. Este comportamento foi relatado por González (2012). A escolha de outros sistemas podem melhorar os níveis de expressão das proteínas recombinantes.

Em 2009, Chaves afirmou que a concentração máxima celular de *E. coli* em cultivos por batelada (3 a 6 g/L) é atingida em tempos que variam de 6 a 14 horas, dependendo do meio de cultivo utilizado. Este fato justifica a baixa concentração celular encontrada no presente trabalho, que com a indução por IPTG chegou a

0,543 g/L ao final de 3 horas de fermentação. Resultados preliminares de cultivo em batelada em biorreator de 10 L, por seis horas e em meio LB (resultados não apresentados), mostram que a concentração celular atinge concentrações bem superiores (1,5 a 3 g/L).

A composição do meio de cultivo utilizado na etapa de fermentação influencia no rendimento celular e na expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. A condição de estresse gerada pela limitação de nutrientes leva a perda dos plasmídeos no interior das células.

Chaves (2009) relatou que a utilização de meios de cultivos à base de glicose costumam levar a rendimentos celulares inferiores e atribuiu este comportamento ao chamado Efeito Crabtree. Este efeito é consequência do acúmulo de metabólitos tóxicos à célula, especialmente o acetato.

O ácido acético é produzido no cultivo de células de *E. coli* de alta densidade, por condições de estresse causada pela limitação de oxigênio ou pelo excesso de glicose presente no meio de cultivo. Concentrações de acetato superiores a 5,0 g/L reduzem a taxa de crescimento celular e o rendimento de biomassa. Também reduzem os níveis de expressão de proteínas recombinantes. (SHIMIZU *et al*, 1988).

O acúmulo de acetato no meio de cultivo de *E. coli* tem sido evitado através do controle da concentração da fonte de carbono. A fermentação das células bacterianas por batelada alimentada e batelada contínua, de forma a manter a concentração da fonte de carbono em níveis limitantes, leva à supressão da síntese de acetato e permite conversão deste em biomassa. Bateladas alimentadas costumam levar a concentrações celulares superiores a 50 g/L, em peso seco. (LIMA, 2004).

Lima (1993) relatou que limitações das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio e outros elementos levaram à redução da estabilidade dos plasmídeos. Em contrapartida, limitações de glicose e amônia promoveram o aumento do número de cópias do plasmídeo no interior das células. O autor concluiu que a utilização de meios complexos, como o meio Jung, proporciona maior estabilidade aos plasmídeos. Outro relato afirma que a redução da taxa de oxigenação também leva a uma maior instabilidade dos vetores no interior das células bacterianas. (KUMAR *et al*, 1991).

5.4.2 Expressão das proteínas recombinantes

A análise de SDS-PAGE das frações de sonicação confirmou a insolubilidade dos corpos de inclusão. As etapas iniciais de sonicação (Fração Solúvel e Fração de Isolamento), que utilizam tampões de baixa concentração de uréia, não levaram à solubilização significativa dos corpos de inclusão. Estas etapas ajudaram na remoção de contaminantes, principalmente de proteínas citoplasmáticas na Fração Solúvel e de proteínas de membrana na Fração de Isolamento. As proteínas de membrana apresentam alta atividade imunogênica e por isso são contaminantes importantes na purificação de insumos para fins de diagnóstico. A utilização de detergentes como Triton X-114, Tween-20 e glicerol é eficiente na remoção destes contaminantes (COLANGELI *et al*, 1998; MALAGHINI, 2008) e por isso compuseram o tampão de isolamento. Com o acréscimo na concentração de uréia para 6 M ocorreu a solubilização destes corpos, conforme apresentado na análise da Fração Clarificada.

5.4.3 Purificação das proteínas recombinantes

A metodologia de purificação das proteínas produzidas se mostrou satisfatória, principalmente para a produção da MTSP-11 recombinante. O rendimento de produção e purificação da proteína MTSP-11 foi de 143,5 mg/L (mg de proteína por litro de meio fermentado). As proteínas CFP-10 e ESAT-6 tiveram rendimento de aproximadamente 23 mg/L.

Colangeli e colaboradores (1998) citam rendimentos de expressão de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* em frasco Erlenmeyer que variam de 0,1 a 5 mg de proteína por grama de biomassa (mg/g). Usando estes valores como comparativo, observa-se a expressão bem sucedida das três proteínas testadas, sendo de aproximadamente 42,36 mg/g para as proteínas ESAT-6 e CFP-10 e 264,27 mg/g proteína MTSP-11.

Os rendimentos de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* relatados são bastante diversos. Basso (2012), por exemplo, relatou rendimento na expressão de glucagon recombinante em *E. coli* em torno de 6,5 mg/L em fermentação líquida em frasco Erlenmeyer. Já Wen e colaboradores (2000)

relataram um rendimento de 80 mg/L de fermentado produzido em biorreator com fermentação de 23 horas.

Vários motivos levam a variações no rendimento de expressão de proteínas recombinantes, incluindo problemas em diferentes níveis como transcrição, tradução, pós-tradução, além de instabilidade da proteína, degradação por proteases e condições inadequadas de expressão. (BUSTAMANTE FILHO, 2010).

Limitações na expressão de proteínas recombinantes podem ser contornadas por dois processos. O primeiro busca utilizar melhores condições de expressão por modificação de parâmetros de fermentação, tais como temperatura de cultivo celular e de indução, meio de cultura utilizado e concentração do agente indutor. (SHIMIZU *et al*, 1988; KUMAR *et al*, 1991; LIMA, 1993; LIMA, 2004; LIMA *et al*, 2003; CHAVES, 2009). O segundo é composto por modificações moleculares que busquem plasmídeos mais eficientes e mais facilmente transcritos. Como exemplos têm-se: uso de promotores mais fortes; fusão do gene da proteína recombinante com o gene de outra proteína endógena de alta expressão; clonagem de várias cópias do gene recombinante no mesmo plasmídeo; escolha de códons que sejam mais compatíveis com o vetor utilizado; co-expressão de chaperonas; uso de vetores deficientes em genes codificantes de protease ou de contaminantes importantes no processo. (GE Healthcare Handbook 28-9095-31).

Na continuidade do presente trabalho algumas destas opções devem ser implementadas, mais especificamente na busca de outras condições para expressão das proteínas. A etapa de otimização da indução adotou como modelo apenas a proteína MTSP-11, justamente a que apresentou o maior rendimento.

É possível que concentrações diferentes de IPTG e/ou induções mais longas possam levar a melhores rendimentos na expressão de CFP-10 e ESAT-6. A troca por meios de cultivos sintéticos com fontes mais ricas de aminoácido, por exemplo, também podem contribuir. A transferência do processo de fermentação para biorreator levará à obtenção de rendimentos celulares mais altos, mas estudos ainda são necessários para avaliar se haverá melhora no rendimento de proteína recombinante produzida por quantidade de biomassa.

5.5 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

5.5.1 Sonicação

A sonicação mostrou-se uma etapa crítica no processo de purificação. Rompimentos celulares insuficientes diminuem a quantidade de corpos de inclusão solubilizados, levando diretamente à redução drástica do rendimento. Esta afirmação não tem tanto impacto nas produções de pequenos volumes, pois o sedimento celular gerado é muito pequeno e pode ser facilmente ressuspensionado e sonicado. No entanto, em processos industriais que geram dezenas de litros de fermentação, esta ressuspensão torna-se mais complexa. Uma ressuspensão mal realizada dificulta a ação do agente de rompimento celular, seja ele químico, bioquímico ou mecânico. Esta limitação torna-se ainda maior considerando sedimentos celulares de grandes volumes.

A velocidade de centrifugação de 5.000 g gera sedimentos menos compactados, e o armazenamento a 4°C não provoca o rompimento celular e consequente aumento da viscosidade. No entanto, o simples congelamento e descongelamento deste sedimento a - 20°C leva à formação de um corpo com alta viscosidade. De forma similar, centrifugações em velocidades superiores a 10.000 g, como acontece nas etapas de sonicação, produzem sedimentos bastante compactos, dificultando a ressolubilização.

Considerando estas limitações, a aplicação da filtração tangencial como metodologia de concentração de biomassa torna-se uma alternativa aplicável a processos industriais. Ao invés de gerar um aglomerado “sólido” de biomassa, a filtração permite a concentração do fermentado até a formação de uma pasta celular. Alguns equipamentos permitem a troca de tampões durante a concentração, eliminando a necessidade de ressuspender a biomassa, como ocorre em processos que usem centrifugações.

Apesar da sonicação já ser considerada aplicável industrialmente há alguns anos, existem alternativas para o rompimento celular que devem ser avaliadas, principalmente o rompimento mecânico por alta pressão. A adição de nucleases também pode ajudar a controlar o aumento da viscosidade do meio, especialmente durante o rompimento celular. Contudo, a adição de nucleases ao processo deve ser

avaliada em cada caso devido ao custo que este aditivo insere no processo. (HARRISON, 2003).

5.5.2 Cromatografia de afinidade

As diferentes metodologias para a cromatografia de afinidade foram necessárias devido às prováveis diferenças na capacidade de ligação à resina de cada proteína.

Eluições de proteínas com maior grau de pureza são possíveis pela adição de imidazol em baixas concentrações aos tampões de amostra e lavagem, uma vez que se evita que proteínas contaminantes possam se ligar fracamente à coluna. No entanto, esta mesma adição pode fazer com que uma parte das proteínas recombinantes não se ligue à coluna pelo mesmo motivo. Buscou-se utilizar, então, a menor quantidade possível de imidazol que levasse a eluição de amostras puras, sem dificultar a ligação das proteínas à resina no início do processo de purificação.

No caso das proteínas ESAT-6 e MTSP-11, a ausência do imidazol no tampão de equilíbrio e na Fração Clarificada levou à eluição outras proteínas junto com a de interesse (dados não apresentados). O mesmo não aconteceu com a proteína CFP-10. Como mostrado nos resultados, mesmo sem o uso de imidazol nas primeiras etapas da cromatografia, não houve eluição de proteínas contaminantes.

Durante a purificação da proteína CFP-10 observou-se que a fração Não Ligada continha a proteína recombinante, apesar da capacidade de ligação de proteínas à resina ser superior à quantidade aplicada. Algumas hipóteses são levantadas, como: (a) parte das proteínas presentes na Fração Clarificada apresentam conformação tal que não expõe a cauda de poli-histidina à resina; (b) por algum erro do processo de transcrição/tradução algumas proteínas podem ter sido produzidas sem a cauda de poli-histidina; (c) a concentração de cloreto de sódio presente nos tampões talvez seja muito elevada, dificultando a ligação das proteínas com a resina ou (d) a vazão de bombeamento dos tampões utilizada seja muito elevada, não permitindo a interação proteína/resina de forma eficiente.

Cada uma destas possibilidades deve ser estudada e avaliada a fim de evitar a perda de proteína recombinante. Modificações moleculares no plasmídeo, de forma a lhe conferir duas caudas de poli-histidina ao invés de uma apenas, também podem ajudar neste processo.

A escolha do gradiente entre o tampão de equilíbrio e o tampão de renaturação é justificada pela necessidade de permitir um renovelamento controlado das proteínas recombinantes quando ligadas à resina. As proteínas são solubilizadas em tampão com alta concentração de uréia devido aos corpos de inclusão. Contudo, esta composição não favorece a conformação naturalmente solúvel das proteínas. O reconhecimento dos anticorpos e, conseqüentemente, a atividade biológica estão atrelados à conformação da proteína. Devido a essas características, promover um renovelamento controlado torna-se importante no processo de purificação. (GE Healthcare Handbook 28-9095-31).

Essa exigência pode ser atendida através do gradiente entre dois tampões semelhantes, um com uréia (tampão de equilíbrio) e outro sem (tampão de renaturação). A remoção gradual da uréia do sistema, na presença de um agente redutor (DTT), permite esta transformação. A utilização do gradiente com concentração crescente de imidazol permite a remoção gradual das proteínas, iniciando por aquelas com ligação mais fraca. A remoção gradativa do agente redutor DDT durante a etapa de renovelamento também pode colaborar com uma maior estabilidade estrutural da proteína recombinante, pois permite a formação de pontes dissulfeto, agora em ambiente aquoso, importantes para a manutenção da conformação estrutural.

Embora seja necessário realizar a avaliação da atividade biológica das proteínas recombinantes produzidas, bem como determinação das concentrações de endotoxinas nas amostras purificadas, a metodologia aplicada foi eficaz na purificação das proteínas, através de uma única etapa de cromatografia. A determinação do processo de purificação em poucas etapas é interessante para permitir o escalonamento do processo de produção e fundamental para a viabilidade de implantação da tecnologia na indústria.

5.5.3 Padronização das amostras

O efeito do descongelamento na estabilidade das proteínas exemplifica a importância de uma atenção especial às condições de renaturação das proteínas insolúveis a fim de se obter produtos estáveis e com atividade biológica.

Renshaw e colaboradores (2002) analisaram as estruturas secundárias e terciárias dos antígenos ESAT-6 e CFP-10. Os autores verificaram a grande

instabilidade da estrutura terciária da proteína ESAT-6, que mesmo *in vivo* apresenta um conjunto de estruturas possíveis. Já a proteína CFP-10 apresentou-se de forma não estruturada em hélices aleatórias, mais estáveis se comparadas à ESAT-6. Surpreendentemente, o estudo aponta a existência de um complexo bastante estável formado pelas unidades de ESAT-6 e CFP-10, na proporção de 1:1, com uma estrutura muito mais regular e estável que as proteínas isoladamente.

Quando se usa sistemas bacterianos para produção de antígenos de eucariotos, é muito frequente a expressão de proteínas na forma insolúvel e desnaturada, agrupadas nos corpos de inclusão. Apesar do renovelamento ser geralmente um problema nestes casos, a produção em corpos de inclusão traz vantagens como possibilidade de altos níveis de expressão, isolamento dos corpos de inclusão com alta pureza, proteção contra ação de enzimas proteolíticas e expressão de proteínas tóxicas à célula hospedeira. (MERCK, 2008).

Para favorecer a expressão das proteínas em sua forma solúvel, tem-se como opção a otimização das condições de cultivo e purificação. Sabe-se que taxas de crescimento celular reduzidas geralmente levam a expressões em formas mais solúveis, diminuindo a tendência à formação dos corpos de inclusão. Para isso, o cultivo em temperaturas menores como 20 a 30°C podem ser utilizadas. Expressões menos intensas também podem levar a formas mais solúveis, o que pode ser obtido por indução com menor concentração de agente indutor em densidades celulares mais baixas (Abs_{600} 0,5) e por períodos de tempos menores. (GE Healthcare Handbook 28-9095-31).

Ainda há outras opções para expressão de proteínas heterólogas na sua forma solúvel, como a troca do organismo de expressão de *E. coli* para leveduras ou células eucarióticas. A redução do tamanho do inserto e, conseqüentemente, a redução da proteína transgênica também reduz a possibilidade de enovelamento desta na forma insolúvel. A síntese de peptídeos, mesmo por via recombinante, tende a levar a produtos mais solúveis.

Como as frações obtidas da cromatografia de afinidade mostraram-se sem qualquer tipo de precipitação, acredita-se que seja possível contornar a precipitação das proteínas evitando-se o congelamento da amostra, que pode receber a adição de conservantes como EDTA e PMSF e ser armazenada a 4°C. Caso o congelamento seja necessário, a adição de crioprotetores como glicerol ou a diluição em concentrações menores podem aumentar a estabilidade desde processo. Mais

estudos são necessários para avaliar qual a melhor metodologia para a produção dos antígenos recombinantes em sua forma solúvel e bio-ativa.

6 CONCLUSÕES

Através da metodologia proposta, concluiu-se que:

- foi possível a obtenção de um banco de pré-inóculos de células *E. coli* contendo os plasmídeos codificantes para as proteínas ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11;
- os pré-inóculos congelados a - 80°C mostraram-se estáveis no período avaliado (1 ano), facilitando o processo de produção das proteínas recombinantes;
- o uso de 0,1 mM IPTG mostrou-se como melhor condição para expressão da proteína recombinante MTSP-11, com duração de apenas 2 horas de indução;
- os parâmetros de fermentação e o sistema de expressão utilizados, apesar de levarem a baixos rendimentos celulares, permitiram a expressão satisfatória das três proteínas avaliadas;
- a metodologia de purificação proposta mostrou-se simples e eficiente para a obtenção das proteínas recombinantes com alta pureza;
- apesar do sucesso na purificação, a solubilidade das proteínas ainda mostrou-se insatisfatória, e precisa ser reavaliada.

7 PERSPECTIVAS

Após confirmação da atividade biológica dos antígenos ESAT-6, CFP-10 e MTSP-11, relatada por trabalhos semelhantes, estes insumos podem ser utilizados em diferentes plataformas (Intradermorreação, ELISA, IFN- γ , Western-blot e etc) para confecção de kits diagnóstico de tuberculose bovina. Estes mesmos antígenos ainda têm uso potencial em vacinas diferenciais (DIVA) que confirmam proteção contra infecção de micobactérias, tornando-se ferramentas importantes para programas de controle e erradicação de tuberculose animal e humana.

REFERÊNCIAS

BASSO, A. M. M. **Produção de glucagon recombinante: expressão, purificação e avaliação de atividade biológica**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília. Brasília/DF, Brasil. 2012.

BANCO MUNDIAL DE INFORMAÇÕES DA SAÚDE ANIMAL (WAHID), 2005-2010. Disponível em: http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map&disease_id=32. Acesso em: 20/04/2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)**/organizadores, Vera Cecília Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. Brasília: MAPA/DAS/DAS, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA) *et al.* Avaliação do andamento do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose & Lançamento da publicação “Situação da brucelose no Brasil”. In ALIMENTANDO O BRASIL PRODUZINDO PARA O MUNDO, 2010, São Paulo. **Palestra**. Disponível em: <http://www.leb.fmvz.usp.br/seminario-pncebt/andamentopncebt>. Acesso em: 20/04/2012.

BUSTAMANTE FILHO, I. C. **Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen**. Tese de Doutorado, UFRS. Porto Alegre/RS, Brasil. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2005). **Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis***. Morbidity and Mortality Weekly Report, 54, p. 605-608. 2005. Disponível em: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5424a4.htm. Acesso em: 25/04/2012.

CHAVES, R. V. A. **Avaliação de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes quanto ao crescimento e expressão de antígenos de *Leishmania chagasi* (kmp11 e p36)**. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal/RN, Brasil. 2009.

COLANGELI, R. *et al.* **Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis***. Journal of Chromatography B, v. 714, p. 223-235. 1998.

DE KANTOR, I.N. *et al.* Bovine Tuberculosis in Latin American Countries. Current situation and recommendations. In 3rd LATIN AMERICAN CONGRESS ON ZOOSES, 2008. Buenos Aires, Argentina. **Palestra**. Disponível em: http://www.rr-america.oie.int/in/proyectos/zoonosis/in_tuberculosis_recomendaciones_ago.html. Acesso em: 20/04/2012

DE LA RUA-DOMENECH, R. *et al.* **Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques**. Research in Veterinary Science, v. 81, p. 190-210, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Atualização em tuberculose bovina**. Comunicado Técnico 121, p 1-11, 2009.

FRÁGUAS, S. de A. *et al.* **Estudo comparativo de métodos complementares para o diagnóstico da tuberculose bovina em animais reagentes à tuberculinização.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 15(3), p. 117-121. 2008.

GE Healthcare Handbook 18-1142-75. **Recombinant Protein Purification Handbook.** Disponível em: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1336168762999/litdoc18114275_20120505001440.pdf. Acesso em: 12/05/2012.

GE Healthcare Handbook 28-9095-31. **Purifying Challenging Proteins.** Disponível em: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Refolding/AMERSHAM_PurifChallengingProt.pdf. Acesso em: 12/05/2012

GONZÁLEZ, A. S. **Produção de reagentes para o teste ELISA para quantificação de proteína não estruturais do vírus causador da febre aftosa em partidas industriais.** Dissertação de Mestrado, UP. Curitiba/PR, Brasil. 2012

HANDISTATUS II, 1996-2004. Disponível em: <http://web.oie.int/hs2/report.asp>. Acesso em: 20/04/2012.

HARRISON, R. G. *et al.* **Bioseparations Science and Engineering.** Oxford University Press. Nova York. p.406. 2003

INVITROGEN. **Gateway® Technology. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems.** ed E. USA:Invitrogen,2003.

KANTOR, I. N.; RITACCO, V. **Bovine tuberculosis in Latin America and Caribbean: current status, control and eradication programs.** Veterinary Microbiology, v. 40(1), p. 5-14, 1994.

KINDE, H., *et al.* **Recovery of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Mycobacterium bovis* from cheese entering the United States through a noncommercial land port of entry.** Journal of Food Protection, v. 70 (1), p. 47-52. 2007.

KUMAR, P. K. P. *et al.* **Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors.** Tibtech, v. 9, p. 279-284. 1991

LIMA, B. D. **Produção de insulina humana através de precursores recombinantes em *Escherichia coli*.** Tese de doutorado, Universidade de Brasília. Brasília/DF. 1993.

LIMA, W. J. N. *et al.* **Influência da temperatura de indução no crescimento celular, na formação de acetato e na produção de pró-insulina humana recombinante utilizando clones *E. coli* n-4830-1.** Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações – CD, 2003.

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular.** Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP. 2004.

LOBUE, P. A. *et al.* **Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000.** The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v. 7 (2), p. 180-185. 2003.

MALAGHINI, M. **Proteínas recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis* para auxílio diagnóstico da tuberculose.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 2008.

MALAGHINI, M. *et al.* **Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis.** Journal of Biotechnology, v. 156, p. 56-58. 2011.

MERCK. **Tools for Enhancing Solubility of Proteins Expressed in *E. coli* and Refolding Screens for Difficult Targets.** 2008. Disponível em: <http://www.merckmilliporechina.com/promart/library/6Expression/Novagen-Tools-for-Enhancing-Solubility-of-Protein-Expression.pdf>. Acesso em 15/05/2012.

MILIAN SUAZO F. *et al.* **Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Queretaro, Mexico.** Revista Latinoamericana de Microbiologia, v.42 (1), p.13-19.2000.

OIE. **Bovine Tuberculosis**, Terrestrial Manual, chapter 2.4.7, p. 1-16. 2009.

QIAGEN. **QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.** 3ª ed. USA: QIAGEN, 2005.

RENSHAW, P. S. *et al.* **Conclusive evidence that the major T-cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6-CFP-10 complex.** Journal of Biological Chemistry, v. 277 (24), p. 21598 – 21603. 2002

RUGGIERO, A. P. *et al.* **Tuberculose bovina: Alternativas para o diagnóstico.** Artigo de Revisão. Arquivos do Instituto Biológico, v.74(1), p.55-65. 2007

SHIMIZU, N. *et al.* **Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with substance concentration monitoring.** Journal of Fermentation Technology, v. 66, p. 187-191. 1988

THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH (CFSPH). **Bovine Tuberculosis.** Iowa State University. p. 1 – 6. 2007.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH (CFSPH). **Imagem.** Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/clinical-signs-photos.php?name=bovine-tuberculosisl>. Acesso em 25/04/2012.

UNIVATES. **Propriedades livres de tuberculose bovinas serão certificadas.** Publicado em 15/12/2010. Disponível em: <http://www.univates.br/noticias/6974-propriedades-livres-de-tuberculose-bovinas-serao-certificadas>. Acesso em: 20/04/2012.

VORDERMEIER, H. M. *et al.* **Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, v. 8(3), p.571-578. 2001.

WHELAN, A. O. *et al.* **Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals.** Journal of Clinical Microbiology, v. 48(9), p. 3176-3181. 2010

WOOD, P. R. *et al.* **A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis.** Veterinary Microbiology, v. 31, p. 71-79, 1992.

WOOD, P. R.; ROTHEL, J. S. **In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis.** Veterinary Microbiology, v. 40, p. 125-135. 1994.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION DATABASE (WAHID). Disponível em:
http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map&disease_id=32. Acesso em:
25/04/2012.

ANEXOS

ANEXO 1 – SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS INSERTOS CODIFICANTES PARA AS PROTEÍNAS ESAT-6, CFP-10 E MTSP-11. FONTE: MALAGHINI (2008).

(As regiões em negrito correspondem às regiões de complementaridade dos iniciadores de reação de PCR)

CFP10

ATGGCAGAGATGAAGACCGATGCCGCTACCCTCGCGCAGGAGGCAGGTAATT
TCGAGCGGATCTCCGGCGACCTGAAAACCCAGATCGACCAGGTGGAGTCGACG
GCAGGTTTCGTTGCAGGGCCAGTGGCGCGGGCGGGCGGGGACGGCCGCCAG
GCCGCGGTGGTGCCTTCCAAGAAGCAGCCAATAAGCAGAAGCAGGAAGCTCGA
CGAGATCTCGACGAATATTCGTCAGGCGCGGTCCAATACTCGAGGGCCGACG
AGGAGCAGCAGCAGGCGCTGTCCT**CGCAAATGGGCTTCTGA**

ESAT6

ATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCAA
TCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCATTCCTCCTTGACGAGGGGAAGCAGTCCC
TGACCAAGCTCGCAGCGGCCTGGGGCGGTAGCGGTTTCGGAGGCGTACCAGGG
TGTCCAGCAAAAATGGGACGCCACGGCTACCGAGCTGAACAACGCGCTGCAGA
ACCTGGCGCGGACGATCAGCGAAGCCGGTCAGGCAATGGCTTCGACCGAAGG
CAAC**GTCACTGGGATGTTGCGCATAG**

MTSP11

ATGGCGCCGGTGACCGACGAACAGGTGGAGCTGGTGCCTCACTGGTCGCGG
CCATCCCACTCGGCCGGGTGTCCACCTACGGCGACATCGCAGCTCTCACAGGG
CTTTCCAGTCCGCGTATTGTCGGCTGGATTATGCGGACCGATTCTCGGATCTG
CCCTGGCACCGGGTGATCAGAGCCTCCGGGCGCCCAGCACAGCACCTGGCCA
CCCGGCAGTTGGAGTTGTTGCGCGCAGAGGGCGTTCTCAGTGTTGACGGCCG
GGTGGCGCTGAGCGAGATCCGCT**ATGAGTTTCCGCCGGGCTGA**

ANEXO 2 – FORMULAÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS NAS ETAPAS DE SONICAÇÃO E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. FONTE: O AUTOR (2012)

Solução de Sonicação - Fração Solúvel

	<i>Massa (g)</i>			
	<i>100mL</i>	<i>300mL</i>	<i>500mL</i>	<i>1000mL</i>
Fosfato Monobásico de Sódio - NaH ₂ PO ₄ – 20mM	0,240	0,720	1,200	2,400
Água Ultrapura q.s.p	100mL	300mL	500mL	1000mL

Corrigir pH para 8,0 usando HCl ou NaOH

Solução de Sonicação - Fração Insolúvel

	<i>Massa (g)</i>			
	<i>100mL</i>	<i>300mL</i>	<i>500mL</i>	<i>1000mL</i>
Fosfato Monobásico de Sódio - NaH ₂ PO ₄ – 20mM	0,240	0,720	1,200	2,400
Cloreto de Sódio – NaCl – 500mM	2,922	8,766	14,610	29,220
Uréia – 8M	48,048	144,144	240,240	480,480
Tween 20 - 2%	2mL	6mL	10mL	20mL
Água Ultrapura q.s.p	100mL	300mL	500mL	1000mL

Corrigir pH para 8,0 usando HCl ou NaOH

Solução de Equilíbrio e Lavagem

	<i>Massa (g)</i>			
	<i>100mL</i>	<i>300mL</i>	<i>500mL</i>	<i>1000mL</i>
Fosfato Monobásico de Sódio - NaH ₂ PO ₄ – 20mM	0,240	0,720	1,200	2,400
Cloreto de Sódio – NaCl – 500mM	2,922	8,766	14,610	29,220
Uréia – 8M	48,048	144,144	240,240	480,480
Imidazol – 10mM	0,068	0,204	0,340	0,681
Água Ultrapura q.s.p	100mL	300mL	500mL	1000mL

Corrigir pH para 8,0 usando HCl ou NaOH

Solução de Renaturação

	<i>Massa (g)</i>			
	<i>100mL</i>	<i>300mL</i>	<i>500mL</i>	<i>1000mL</i>
Fosfato Monobásico de Sódio - NaH ₂ PO ₄ – 20mM	0,240	0,720	1,200	2,400
Cloreto de Sódio – NaCl – 500mM	2,922	8,766	14,610	29,220
Imidazol – 10mM	0,068	0,204	0,340	0,681
Água Ultrapura q.s.p	100mL	300mL	500mL	1000mL

Corrigir pH para 8,0 usando HCl ou NaOH

Solução de Eluição

	<i>Massa (g)</i>			
	<i>100mL</i>	<i>300mL</i>	<i>500mL</i>	<i>1000mL</i>
Fosfato Monobásico de Sódio - NaH ₂ PO ₄ – 20mM	0,240	0,720	1,200	2,400
Cloreto de Sódio – NaCl – 500mM	2,922	8,766	14,610	29,220
Imidazol – 500mM	3,404	10,212	17,020	34,040
Água Ultrapura q.s.p	100mL	300mL	500mL	1000mL

Corrigir pH para 8,0 usando HCl ou NaOH

ANEXO 3 – FORMULAÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NO SDS-PAGE. FONTE: O AUTOR (2012).

Tampão de Corrida (5x)

Tris Base	15,1	g
Glicina	94	g
SDS	5	g
Água Ultrapura q.s.p	1	L

Ajustar pH para 8,8 usando HC l e armazenar a 4°C

Tampão de Coloração

Coomassie Brilliant Blue (PlusOnePhastGel Blue R-350)	1	Pastilha (100mg)
ÁguaUltrapura	36	mL
Metanol	36	mL
ÁcidoAcético Glacial	8	mL

Filtrar em Papel Filtro Qualitativo e armazenar a temperatura ambiente ao abrigo da luz

Tampão de Descoloração

Metanol	450	mL
ÁcidoAcético Glacial	100	mL
Água Ultrapura q.s.p	1000	mL

Armazenar a temperatura ambiente

SoluçãoAcrilamida Mix 30%

Acrilamida	14,5	g
N,N' metilbisacrilamida	0,5	g
Água Ultrapura q.s.p	50	mL

Filtrar em Papel Filtro Qualitativo e armazenar a 4°C

SoluçãoTris 1,5 M pH 8,8

Tris Base	18,171	g
Água Ultrapura q.s.p	100	mL

Ajustar pH para 8,8 usando HC l

Filtrar em Papel Filtro Qualitativo e armazenar a 4°C

Solução Tris 1,0 M pH 6,8

Tris Base	6,057	g
Água Ultrapura q.s.p	50	mL

Ajustar pH para 6,8 usando HC I
Filtrar em Papel Filtro Qualitativo e armazenar a 4°C

Solução SDS 10%

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)	0,5	g
Água Ultrapura q.s.p	5	mL

Armazenar a temperatura ambiente

Solução APS 10%

APS (Persulfato ou Peroxidissulfato de Amônio)	0,5	g
Água Ultrapura q.s.p	5	mL

Aliquotar em microtubos (200 uL) e congelar a -20°C (uso único)

Solução Tris 50 mM pH 6,8

Tris Base	0,061	g
Água Ultrapura q.s.p	10	mL

Ajustar pH para 6,8 usando HC I

Solução Redutora (Tampão Amostra)

DTT (Ditiotreitol)	0,0771	g
SDS	0,1	g
Azul de Bromofenol	0,005	g
Solução Tris 50 mM pH 6,8 q.s.p	4,5	mL
Glicerol Anidro	0,5	mL

Aliquotar em microtubos (300 uL) e congelar a -20°C (uso único)

ANEXO 4 – COMPOSIÇÃO DO GEL DE ELETROFORESE DO SDS-PAGE. FONTE: O AUTOR (2012)

Soluções para preparo de 15 mL do Gel de Separação 15% para SDS-PAGE	
Água Ultrapura	3,4 mL
Solução Acrilamida Mix 30%	7,5 mL
Solução Tris 1,5 M (pH 8,8)	3,8 mL
Solução SDS 10%	0,15 mL
Solução APS 10%	0,15 mL
TEMED	0,006 mL

Soluções para preparo de 5 mL do Gel de Empilhamento 5% para SDS-PAGE	
Água Ultrapura	3,4 mL
Solução Acrilamida Mix 30%	0,83 mL
Solução Tris 1,5 M (pH 8,8)	0,63 mL
Solução SDS 10%	0,05 mL
Solução APS 10%	0,05 mL
TEMED	0,005 mL